



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사학위논문

Betaine 의 Betaine-Homocysteine Methyltransferase 유도과
AMP-activated Protein Kinase 활성화에 의한 지방간 억제

Inhibition of lipogenesis by betaine involves
activation of AMPK via upregulation of
betaine-homocysteine methyltransferase in liver

2016 년 8 월

서울대학교 대학원
약학과 예방약학 전공
안 철 원

Betaine 의 Betaine-Homocysteine Methyltransferase 유도과
AMP-activated Protein Kinase 활성화에 의한 지방간 억제

Inhibition of lipogenesis by betaine involves
activation of AMPK via upregulation of
betaine-homocysteine methyltransferase in liver

지도교수 김 영 철

이 논문을 약학박사학위논문으로 제출함
2015 년 12 월

서울대학교 대학원
약학과 예방약학전공
안 철 원

안철원의 약학박사학위논문을 인준함
2015 년 12 월

위 원 장 정 진 호 (인)

부위원장 김 상 건 (인)

위 원 이 병 훈 (인)

위 원 김 상 겸 (인)

위 원 김 영 철 (인)

국문 초록

지방간의 생성은 고지혈증, 제2형 당뇨 같은 대사증후군 관련 질병의 발병에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) 효소는 간 세포내 지방축적을 억제하는 유망한 타겟으로 연구되고 있다. 최근 본 실험실 연구에서, homocysteine 을 methionine 으로 remethylation 시키는 과정에서 betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) 의 기질로 사용되는 betaine 을 고지방 식이와 함께 투여 하였을 때, 간 내 지질의 축적이 감소하였다. Betaine 의 투여는 지질합성에 관여하는 효소인 AMPK 와 ACC 의 인산화를 증가시키고, 전사인자인 liver X receptor α (LXR α) 와 활성형 sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) 의 단백질 발현을 감소시켰다. 그리고 betaine 의 투여는 BHMT 단백질 발현을 증가 시켰으며, 간내 homocysteine 농도를 감소시켰다. 따라서 본 연구는 이러한 선행연구를 바탕으로 BHMT 증가를 통한 betaine 의 homocysteine 저하작용이 간 내 지질대사에 미치는 영향 및 기전을 밝히고자 하였다.

랫트에게 methionine-choline deficient (MCD) 식이와 함께 1 % betaine 을 식수로 3 주간 투여 하였을 때, betaine 의 투여는 중성지방의 축적을 억제 하였다. MCD 식이를 공급한 랫트의 간에서 BHMT 단백질 발현은 감소하고 homocysteine 농도는 증가하였다. Betaine 병용투여는 MCD 식이에 의한 homocysteine 농도증가를 정상화시켰다. 또한 AMPK, ACC, SREBP-1c 그리고 LKB1 의 단백질 인산화는 MCD 식이에 의하여 감소하였으며 betaine 의 공급에 의해 회복 또는 증가하였다.

동물실험결과를 바탕으로 betaine 의 투여가 AMPK 의 활성화에 미치는 영향을 HepG2 세포주와 H4IIE 세포주에서 연구하였다. HepG2 세포주에서 betaine 의 처리는 AMPK 의 활성화에 영향을 미치지 못하였다. BHMT 가 발현되는 H4IIE 세포주에서 betaine 의 처리는 BHMT 단

백질의 발현을 증가시키고, 세포내 homocysteine 의 농도를 감소시켰다. H4IIE 세포주에서 betaine 의 처리는 AMPK, ACC, 그리고 SREBP-1c 인산화를 증가시켰다. 반면 HepG2 세포주에서 homocysteine 의 처리는 AMPK, ACC, SREBP-1c, 그리고 LKB1 의 인산화를 감소시켰다. 또한 AMPK 의 activator 로 알려져 있는 metformin 의 처리는 HepG2 세포주에서 AMPK, ACC 그리고 SREBP-1c 의 인산화를 증가시켰고, 이는 metformin 과 homocysteine 병용처리에 의하여 저해되었다. Cystathionine β synthase (C β S) 의 저해제인 hydroxylamine (HA) 을 HepG2 세포주에 처리하였을 때, C β S 단백질 발현 감소와 homocysteine 농도의 증가를 확인하였다. HA 1 mM 투여는 AMPK, ACC 그리고 SREBP-1c 의 인산화를 감소 시켰다. 그러나 H4IIE 세포주에서 homocysteine 의 전처리인 BHMT 단백질 발현을 감소시키고, 세포내 homocysteine 농도를 증가시켰다. Homocysteine 과 betaine 의 병용처리인 BHMT 효소의 단백질 발현을 증가시키고, 세포내 homocysteine 농도를 감소시켰다. 또한 homocysteine 과 betaine 의 병용 처리는 homocysteine 에 의해 감소한 AMPK, ACC 그리고 SREBP-1c 의 인산화를 회복 또는 증가시켰다.

본 연구결과를 종합하면, 랫트에 대한 MCD 식이 투여와 hepatoma cell line 대한 homocysteine 의 직접적인 처리로 인한, 간세포 내의 homocysteine 농도의 증가는 직접적으로 AMPK 의 활성화를 억제하여 지질합성을 증가를 가져온다. 또한 betaine 에 의한 지질생성 억제효과는 간에서 BHMT 의 유도를 통해 homocysteine 의 제거를 촉진함으로써 AMPK 활성화를 유발함으로써 일어남을 보여준다. 따라서 본 연구는 간에서 homocysteine 농도증가에 의해 AMPK 의 활성화가 저해됨을 밝힌 첫 번째 연구라는 것에 큰 의미를 가진다. 결과적으로 본 연구실험결과는 betaine 의 지질생성 억제 효과는 BHMT upregulation 을 통해 homocysteine 대사를 촉진함으로써 나타남을 시사하고 있다.

주요어: Non-alcoholic fatty liver disease, Triglyceride, Betaine, Homocysteine, Betaine-homocysteine methyltransferase, Adenosine monophosphate-activated protein kinase, Acetyl-CoA carboxylase, Sterol regulatory element binding protein-1c, Endoplasmic reticulum stress

학번: 2008-23248

목 차

국문초록	1
목 차	4
List of Tables and Figures	6
List of Abbreviations	9
서 론	11
1. 비알코올성 지방간	12
2. 황함유 아미노산 대사	14
3. Betaine	18
4. AMPK	26
5. 연구 목적	31
실험재료 및 방법	33
1. 실험재료	33
1. 시약 및 화학물질	33
2. 항체	34
2. 동물 실험	35
1. 비알코올성 지방간 유발모델	35
2. 혈장의 분리	35
3. 간의 S9 분획의 분리	37
4. Methionine 함량측정	37
5. SAM 및 SAH 함량측정	38
6. Homocysteine 함량측정	38
7. 단백질 함량 측정	39
8. 단백질 발현 측정	40
9. 조직 중 중성지방 함량 측정	41

10. Oil red O staining	41
11. 혈액 중 total cholesterol 함량 측정	42
3. 세포 실험	42
1. 세포 배양	42
2. 세포의 total whole lysate 분획의 분리	43
3. 세포내 homocysteine 함량 측정	43
4. 세포의 단백질 함량 측정	43
5. 세포내 단백질 발현 측정	44
4. 통계 처리	44
결 과	45
PART I. MCD 식이 공급에 의한 지방간 생성과 betaine 의 영향	45
PART II. 간세포에서 AMPK 활성화에 대한 betaine 과 homocysteine 의 영향	55
고 찰	72
결 론	82
참고문헌	83
Abstract	107
감사의 글	109

List of Tables and Figures

Table 1. Body weight, liver weight, liver weight/body weight, and betaine intake in the rats fed a control or MCD diet.	46
Table 2. Hepatic methionine, SAM, SAH, and homocysteine levels in the rats fed a control or MCD diet.	53
Figure 1. Sulfur-containing amino acid metabolism.	17
Figure 2. Oxidation of choline to betaine.	19
Figure 3. Composition of the MCD diet.	36
Figure 4. Hepatic triglyceride level in the rats fed MCD diet with betaine treatment.	48
Figure 5. Histopathological examination of the liver. Oil Red O staining of liver sections.	49
Figure 6. Plasma total cholesterol level in the rats fed MCD diet with betaine treatment.	50
Figure 7. Hepatic expressions of pAMPK, pACC, pSREBP-1c, and pLKB1 in the rats fed MCD diet with betaine treatment.	51
Figure 8. Hepatic expression of BHMT and MAT I/III in the rats fed or MCD diet with betaine treatment.	54

Figure 9. Effects of betaine on phosphorylation of AMPK, ACC, SREBP-1c, and LKB1 in HepG2 cells.	56
Figure 10. Effects of betaine on phosphorylation of AMPK, ACC, SREBP-1c, and LKB1 in H4IIE cells.	57
Figure 11. Effects of betaine on protein expression of BHMT in H4IIE cells.	58
Figure 12. Effects of betaine on cellular homocysteine level in H4IIE cells.	59
Figure 13. Effects of homocysteine on phosphorylation of AMPK, ACC, SREBP-1c, and LKB1 in HepG2 cells.	61
Figure 14. Effects of metformin and homocysteine on phosphorylation of AMPK, ACC, SREBP-1c, and LKB1 in HepG2 cells.	63
Figure 15. Effects of hydroxylamine (HA) on protein expression of C β S in HepG2 cells.	65
Figure 16. Effects of hydroxylamine (HA) on cellular homocysteine level in HepG2 cells.	66
Figure 17. Effects of hydroxylamine (HA) on phosphorylation of AMPK, ACC, SREBP-1c, and LKB1 in HepG2 cells.	67
Figure 18. Changes in activation of the AMPK pathway in H4IIE cells treated with homocysteine and/or betaine.	69

Figure 19. Changes in the cellular homocysteine level in H4IIE cells treated with homocysteine and/or betaine.	70
Figure 20. Changes in the protein expression of BHMT in H4IIE cells treated with homocysteine and/or betaine.	71
Figure 21. Proposed mechanism of betaine to the AMPK activation and lipogenesis.	81

List of Abbreviations

5-MTHF	5-methyltetrahydrofolate
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ADP	Adenosine diphosphate
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside
AMP	Adenosine monophosphate
AMPK	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
ApoB	Apolipoprotein B
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosine triphosphate
BHMT	Betaine-homocysteine methyltransferase
CaMKK	Ca ²⁺ /CaM-dependent protein kinase kinase
CβS	Cystathionine β-synthase
CDO	Cysteine dioxygenase
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
CPT-1	Carnitine palmitoyltransferase 1
CγL	Cystathionine γ-lyase
DGAT	Diglyceride acyltransferase
ER	Endoplasmic reticulum
FAS	Fatty acid synthase
GADD	Growth arrest and DNA damage inducible proteins
GCL	γ-glutamylcysteine lygase
G-6-P	Glucose-6-phosphatase
GPAT	Glycerol-3-phosphate acyltransferase
GRP78/BiP	78 kDa glucose-regulated protein/binding immunoglobulin protein
GS	Glycogen synthase
GSH	Glutathione

HA	Hydroxylamine
HMLF	High-methionine low-folate
HSP90	Heat shock protein 90
IL-8	Interleukin-8
IRE1 α	Inositol-requiring enzyme 1 α
L-PK	L-type pyruvate kinase
LKB1	Liver kinase B1
LXR α	Liver X receptor α
MAT	Methionine adenosyltransferase
MCD	Methionine-choline deficient
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MO25	Mouse protein 25
MS	Methionine synthase
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate reductase
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
PEMT	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKC	Protein kinase C
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
SAH	S-adenosylhomocysteine
SAM	S-adenosylmethionine
SREBP-1c	Sterol regulatory element binding protein-1c
STRAD	Ste20 related adaptor protein
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase-1
UPR	Unfolded protein response
VLDL	Very low-density lipoprotein

서론

간 질환은 원인에 따라 바이러스로 인한 간질환, 면역계통 이상으로 인한 자가면역성 간질환, 약물이나 독성물질로 인한 독성 간질환, 과음으로 인한 알코올성 간질환, 고지방 식이 또는 고탄수화물 식이섭취로 인한 비알코올성 간질환 및 기타 원인이 불분명한 간질환으로 구분된다 (Zang et al., 2016; Lieber & DeCarli, 1991; Luyckx et al., 2000). 현대 사회의 급속한 발전과 함께 개인의 생활습관 및 식생활에 많은 변화가 초래되었으며 식습관 변화로 인한 비만인구의 증가는 사회적으로 중요한 문제로 대두되고 있다. 특히 식생활의 변화 및 운동부족으로 인한 비알코올성 지방간 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 의 발병률은 점점 증가하고 있는 상태이다. 특히, 미국에서는 만성간질환 환자에서 비알코올성 지방간이 가장 흔하게 나타났다. 미국에서 만성 간질환 환자 중에서 비알코올성 지방간 발병률은 1988-1994 년도에 46.8 % 였지만, 2005-2008 년에는 75.1 % 로 지난 20 년 간 비알코올성 지방간 발병률이 점점 증가하고 있다 (Younossi et al., 2011). 미국에서 이러한 비알코올성 지방간 환자의 증가는 같은 기간 동안 비만, 내장 비만, 제 2 형 당뇨병의 증가와 연관이 있었다. 미국뿐만 아니라 전 세계적으로도 비알코올성 지방간의 유병률은 높은 상태이다. 2014 년 World Gastroenterology Organization 의 보고에 따르면, 유럽과 중동 지방의 비알코올성 지방간 유병률은 30-40 % 이고, 그중 당뇨병환자에서는 75 %, 고도비만 환자에서는 90-95 % 의 비알코올성 지방간 유병률을 나타냈다 (Review et al., 2014). 동아시아에서 비알코올성 지방간의 유병률은 일본 18 %, 그리고 중국 15 % 로서 유럽과 미국의 유병률 보다는 낮지만 그 추세가 점점 증가하는 상태이며, 특히 중국은 산업화로 인해 지난 10 년간에 비해 약 2 배 증가한 상태이며 도시로 갈수록 높은 유병률을 보인다 (Hamaguchi, 2005; Park et al., 2006; Fan and Farrell, 2009). 우리나라의 경우 역시 서구화된 식습관으로 인한 비만과 그에 따른 비알

코올성 간질환의 유병률이 높아지고 있어, 국민 건강을 크게 위협할 뿐만 아니라 이를 치료하기 위한 비용으로 인한 국가적인 손실도 막대한 실정이다. 한국 성인의 비알코올성 지방간 유병률이 2004년 11.5 % 에서 2010년 23.6 % 로 두 배 이상 증가된 것으로 보고되었다 (2013 식약처 보도자료). 하지만 비알코올성 지방간에 대한 연구와 치료는 그 중요성이 높아지고 있는데 반해, 이에 대한 효율적인 관리방법과 유효한 치료제의 개발은 아직까지 부족한 실정이다.

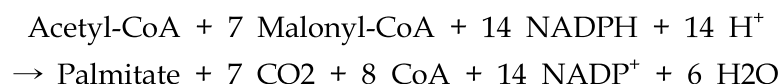
비알코올성 지방간은 간염 (Hepatitis) 이나 섬유화 (Fibrosis) 을 일으키는 비알코올성 지방간염 (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 에서, 나아가 간경변 (Cirrhosis) 과 간암 (Liver cancer) 으로 발전될 수 있다 (Matteoni et al., 1999). 통계청의 자료에 따르면 2014 년 한국인의 사망원인 가운데 간 질환에 의한 사망자 수는 인구 10만 명당 13.1 명이며 이는 사망 원인들 가운데 8 번째에 해당한다. 특히, 남성의 경우 간 질환에 의한 사망자는 10 만명 당 19.9 명에 달한다. 악성 신생물 (암) 에 의한 사망률 (10 만명 당 150.9 명) 이 전체 사인 중 가장 큰 비율을 차지하는 가운데, 이중 간암 (10만명 당 22.8 명) 이 두 번째로 높은 사망원인으로 밝혀졌다 (통계청, 2015). 따라서 간 질환은 한국인의 건강을 위협하는 주요 병증으로 생각되며, 이러한 간 질환의 예방 및 치료를 위한 많은 연구가 필요한 실정이다.

1. 비알코올성 지방간

비알코올성 지방간은 음주력이 없는 환자에게서 알코올성 간질환의 양상과 비슷한 간 기능 장애 및 조직손상이 초래되는 경우를 통틀어 말하며 단순한 지방 축적에서 간경화에 이르기까지 광범위한 간조직의 변화를 포함한다. 비알코올성 지방간염 환자의 20 % 이상이 간경변으로 발전하며, 이들 중 절반은 간기능이 정상적이지 못해 생명에 지장을 받을 수 있다고 보고되고 있다 (Matteoni et al., 1999). 만약 이차적인 병

인에 노출될 경우 급속한 병변의 진행과 치명적인 결과에 이를 수 있기 때문에 비알코올성 지방간은 임상적 중요성이 증가하고 있으며, 비만, 인슐린 저항성, 고중성지방혈증 등이 위험인자로 알려져 있다 (Portincasa et al., 2005). 간 세포내 중성지방 (triglyceride) 의 축적은 비알코올성 지방간의 특징이다. 간은 지방산의 유입, 중성지방의 합성 및 배출 등의 지방대사에서 중추적인 역할을 하는 장기이며, 이러한 과정의 간내 불균형이 지방간을 유발 할 수 있다 (Ferré and Foufelle F, 2010).

중성지방은 glycerol 중심에 3 개의 acyl화된 긴 사슬 지방산이 연결되어 있는 형태로서 주로 간에서 생성되며, 지방조직과 골격근의 가장 주요한 저장형태이다. 긴 사슬 지방산은 간에서 acetyl-CoA로부터 합성되며, 그 과정에서 acetyl-CoA carboxylase (ACC)는 속도결정단계 효소로서 작용한다. Acetyl-CoA는 ACC의 작용으로 malonyl-CoA를 생성하며, 생성된 malonyl-CoA는 acetyl-CoA, NADPH와 함께 fatty acid synthase (FAS)의 기질로 사용되어 palmitate와 같은 긴 사슬 지방산을 형성하며, 그 과정은 다음과 같다 (Sedgwick et al., 1977; Baron et al., 2004; Kim et al., 1997).



생성된 긴 사슬 지방산은 fatty acyl-CoA를 형성하고, glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)의 작용에 의해 glycerol-3-phosphate에 acyl기를 전달함으로써 glycerolipid를 생성한다. GPAT에 의해 생성된 glycerolipid는 diglyceride acyltransferase (DGAT)의 작용에 의하여 최종적으로 중성지방 (triglyceride)을 형성한다 (Nguyen et al., 2008). 간에서 생성된 중성지방은 very low-density lipoprotein (VLDL)의 형태로 혈액으로 배출되

기 때문에 간에서의 중성지방 합성의 증가는 혈액, 지방조직에서 지질 증가를 일으킨다. 따라서 간에서 중성지방을 생성하는 지질생성 과정의 억제 는 비알코올성 지방간을 예방과 비알코올성 지방간과 연관된 질병을 예방하는 중요한 목표점으로 여겨진다.

2. 황함유 아미노산 대사

황함유 아미노산 대사과정 (Figure 1) 은 황을 함유하는 아미노산인 methionine 과 cysteine 을 포함하여 궁극적으로 taurine 과 glutathione (GSH) 를 합성하는 경로이며, 생체의 항산화 활성유지에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Cooper, 1983; Finkelstein, 1990; Stipanuk, 2004).

2. 1. 간에서의 황함유 아미노산 대사

황을 포함하는 아미노산인 methionine 의 대사는 간에서 중추적으로 이루어 진다 (Mato et al., 2002). 간에서 methionine 은 methionine adenosyltransferase (MAT) 에 의하여 adenosine 기와 합쳐져 S-adenosylmethionine (SAM) 으로 전환된다. SAM 은 체내에서 주요한 transmethylation 반응의 methyl 기 공여자로서 작용하고, transsulfuration, polyamine 합성의 대사경로에 관여한다 (Lu, 2002). Methyltransferase 에 의하여 촉매되어 SAM 의 methyl 기가 전달된 후 S-adenosylhomocysteine (SAH) 이 생성되며, transmethylation 반응은 많은 생체물질의 대사에 영향을 주어 생리화학적 변화를 유발한다. Hormone, 신경전달 물질, 핵산, 단백질, 인지질과 외인성 물질 등이 SAM 에 의하여 methylation 이 되며, 이러한 반응은 SAM 의 유용성에 영향을 받는다 (Cantoni, 1975).

SAM 이 transmethylation 반응에 사용이 된 후, 생성되는 SAH 는

SAH hydrolase 에 의하여 가수분해 되어 homocysteine 과 adenosine 으로 분리된다 (Eloranta and Kajander, 1984). Homocysteine 은 methionine synthase (MS) 와 betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) 에 의해 methionine 으로 remethylation 되는 과정을 거친다 (Finkelstein, 2000). 따라서 methionine 으로부터 homocysteine 을 거쳐 다시 methionine 으로 돌아오는 과정은 methionine cycle 또는 remethylation cycle 이라고도 불린다. 한편, homocysteine 은 cystathionine β -synthase (C β S) 에 의하여 serine 과의 축합을 통해 cystathionine 으로 변환되고, 이어서 cystathionine γ -lyase (C γ L) 의 작용으로 cysteine 을 생성하여 transsulfuration 과정으로 진행된다 (Banerjee et al., 2003). Sulfhydryl 기를 함유한 아미노산인 cysteine 은 간에서 GSH 로 전환되어 혈액을 통해 다른 기관에 공급되거나, 비가역적으로 taurine 또는 inorganic sulfate 로 대사되어 주로 뇨를 통하여 배설된다 (Lu, 2000a.; Stipanuk et al., 2006). 간에서 GSH 의 합성은 기질인 cysteine 의 유용성과 γ -glutamylcysteine lygase (GCL) 의 활성화에 의하여 결정된다. GCL 은 oxidative stress 에 의해 활성이 증가하며, GSH 의 농도에 의하여 feedback inhibition 을 받는다. 또한 cysteine 의 농도가 감소할 경우 cysteine 은 주로 GSH 로 전환되며, cysteine 의 유용성이 증가할 경우, cysteine dioxygenase (CDO) 의 활성 증가에 의해 taurine 합성은 증가한다 (Stipanuk et al., 2006). 황함유 아미노산 대사과정은 다른 장기에서 보다 간에서 활발히 일어나는 것으로 알려져 있다 (Finkelstein, 1990).

2. 2. 비알코올성 지방간에서 황함유 아미노산 대사과정의 변화

1960년대 간 질환 환자에게 있어서 methionine 의 체내 대사 감소가 보고된 이후 다양한 간 손상 모델에서 황 함유 아미노산 대사과정의 교란과 이로 인한 황 함유 아미노산 대사체들의 농도 변화 및 이들 대사

체들의 역할이 주목받고 있다 (McClain et al., 2004a; McClain et al., 2004b; Lu and Mato, 2005).

식이 중 methionine 및 choline 공급을 제한하는 methionine-choline deficient (MCD) 식이 모델과 간에서 SAM 합성효소인 *MAT1A* 를 knockout 시킨 마우스를 이용해 비알코올성 지방간과 관련된 연구가 이루어 졌다 (Eastin et al., 1997; Chawla et al., 1998; Lu et al., 2001). MCD 식이 모델에서 간의 SAM 농도의 저하가 유발되었으며, 지질 침착이 일어나고 장기간 MCD 식이 공급 시 간경화로 발전하여 결국 간암으로 진행되었다 (Eastin et al., 1997; Chawla et al., 1998). *MAT1A* knockout 마우스에서도 간의 SAM, GSH 고갈 및 macrovesicular fat 의 축적과 염증반응이 나타났으며, 시간이 경과함에 따라 간암으로 진행하였다 (Martinez-Chantar et al., 2002a; Martinez-Chantar et al., 2002b). 두가지 비알코올성 지방간 모델에서 발현된 간의 병리학적 현상 및 황함유 아미노산 대사과정의 변화가 거의 유사하였으며, 따라서 황함유 아미노산 대사과정의 교란이 비알코올성 지방간의 주요한 원인임이 제안되었다 (McClain et al., 2004b).

또한 3 주간 고지방 (High fat) 식이를 사용하여 비알코올성 지방간을 유도한 본 실험실 선행 연구에서, 고지방 식이의 투여는 랫트의 간에서 지질의 침착을 증가시켰고 hydroxyl radical 과 peroxy radical 에 대한 scavenging capacity 를 감소시켰으며, 염증관련 지표인 TNF α 의 농도를 증가시켰다 (Kwon et al., 2009). 이러한 간 손상증가는 고지방 식이의 투여가 SAM 과 SAH 의 비율을 감소시키며, GSH 의 농도 감소를 일으켜 황함유 아미노산의 대사경로를 교란함으로써 일어나는 것으로 보인다. 따라서 황함유 아미노산 대사경로의 교란은 비알코올성 지방간 생성을 비롯한 여러 간 손상에 중요한 기전이 될 수 있으며, 황함유 아미노산 대사과정 교란의 정상화는 비알코올성 지방간의 중요한 치료점이 될 수 있음을 암시하고 있다.

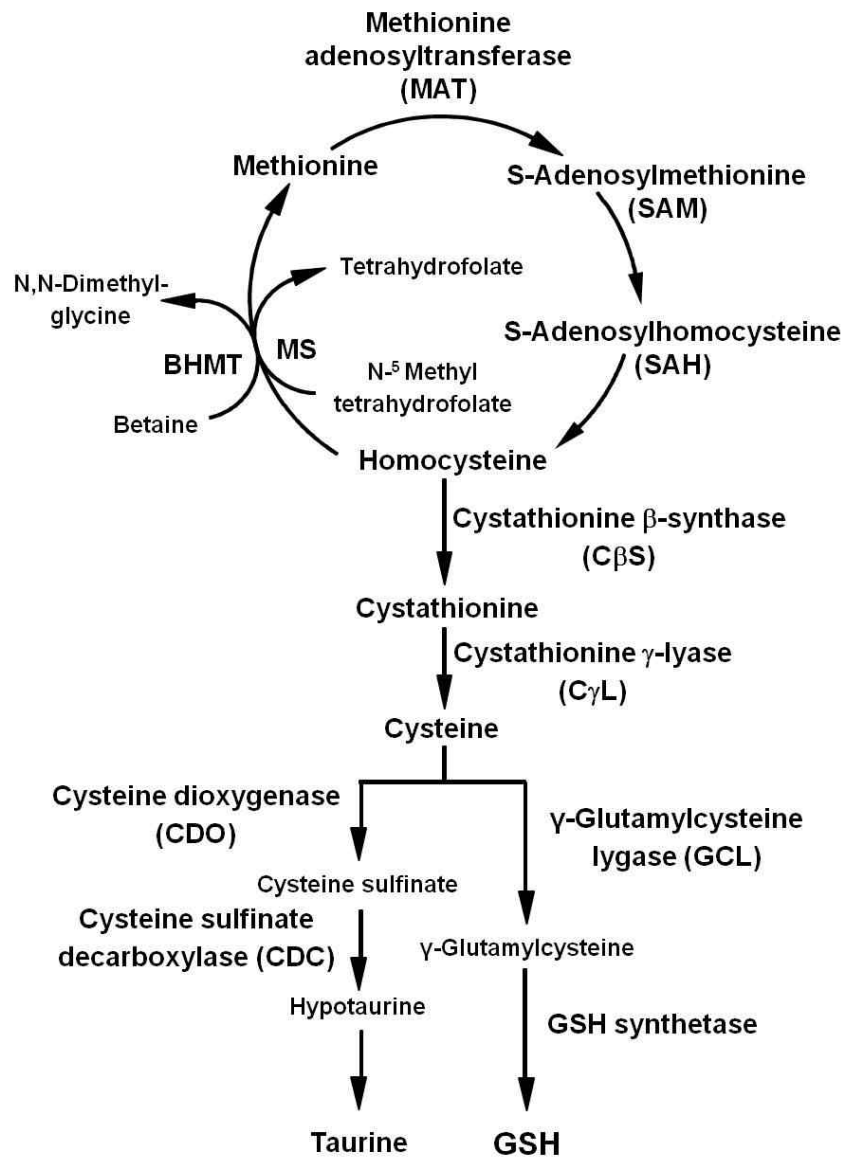


Figure 1. Sulfur-containing amino acid metabolism

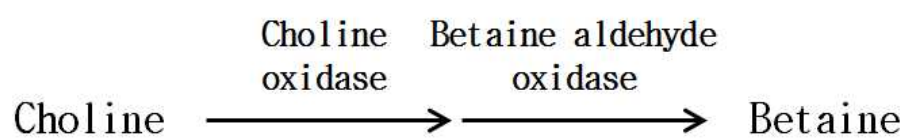
3. Betaine

Betaine 은 중국 최고 의약서인 신농본초경 (神農本草經) 에서 상약 (上藥) 으로 기재되어 있는 구기자 (枸杞子, *Lycium chinense*) 의 열매에서 추출한 주요한 유효성분으로, 동양에서는 전통적으로 간 기능 이상에 사용되어 왔다. Betaine 은 중성의 수용액에서 양쪽성을 가지는 4 급 아민이며, trimethylglycine, 또는 glycine betaine 으로도 불리워진다.

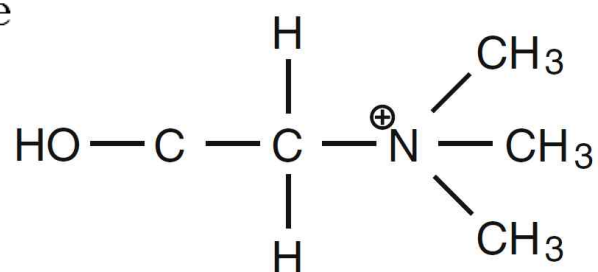
3. 1. 분포 및 공급

랫트의 간에서 betaine 농도는 약 2 ~ 4 mM, 혈중에서 20 ~ 70 μ M 이 존재하며, betaine 은 시금치, 새우, 밀배아, 그리고 밀겨울 등과 같은 식이에 널리 함유되어 있고, 체내에서는 choline 의 비가역적인 산화과정을 통하여 생성된다 (Barak and Tuma, 1979). Choline 으로부터 betaine 의 합성은 2 가지 효소과정을 통하여 이루어진다 (Figure 2). 먼저 미토콘드리아에 존재하는 choline dehydrogenase (혹은 choline oxidase) 에 의해 betaine aldehyde 로 전환된 후 미토콘드리아 또는 cytoplasm 에서 betaine aldehyde dehydrogenase 에 의해 이차적인 산화과정을 거쳐 이루어지며, choline oxidase system 에 관여하는 효소들의 활성은 간과 신장에서 가장 높다 (Zeisel, 1981; Grossman and Herbert, 1989).

체내 betaine 의 공급원인 choline 은 식이 또는 phosphatidylcholine (lecithin) 의 대사에 의한 체내 합성으로 공급되며, 부분적으로 acetylcholine 및 betaine 으로 전환 되지만 phosphatidylcholine 의 재합성이 95 % 를 차지한다 (Zeisel, 2006). Phosphatidylcholine 의 합성은 choline 이 인산화를 거쳐 cytidine diphosphocholine 으로 전환되고 이후 diacylglycerol 과의 축합을 통해 phosphatidylcholine 이 생성되는



Choline



Betaine

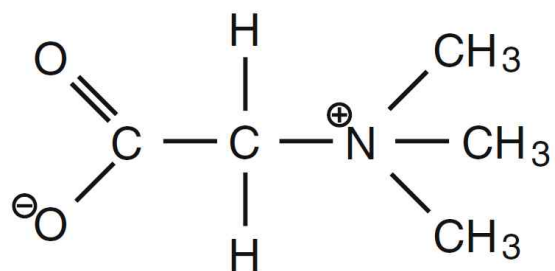


Figure 2. Oxidation of choline to betaine

반응과 phosphatidylethanolamine 이 3 분자의 SAM 으로부터 methyl 기를 전달받아 phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) 작용 의하여 phosphatidylcholine 이 합성되는 과정으로 나누어지는데, 간에서는 choline 의 인산화 반응으로 인한 합성이 70% 정도로 우세하다 (Zeisel, 2006). PEMT 효소가 결핍된 동물실험을 통하여 PEMT 에 의한 phosphatidylcholine 의 생성은 주요한 SAM 의 소모경로이며, homocysteine 생성경로라는 것이 확인되었다 (Stead et al., 2006). Choline 의 인산화로부터 phosphatidylcholine 생성되는 과정은 체내 betaine 의 전구체인 choline 의 소모를 가져와 betaine 농도에 영향을 줄 수 있으며, PEMT 에 의한 phosphatidylcholine 생성과정은 3 분자의 SAM 을 소모하는 과정으로서 SAM 의 소모와 homocysteine 농도를 증가시켜 betaine 농도에 영향을 주게 된다. 따라서 phosphatidylcholine 생성과정 2 가지 모두 체내 betaine 농도에 영향을 줄 수 있으며, betaine 농도에 의해 영향받을 수 있을 것으로 추정된다.

3. 2. 생리작용

Betaine 의 생리작용은 세포 내 삼투압 조절 및 homocysteine 에 methyl 기를 전달하여 methionine 을 합성하는 methyl donor 로서 황 함유 아미노산 대사에 영향을 미치는 작용이라고 알려져 있다 (Craig, 2004). 삼투압 조절 측면에서 betaine 은 다양한 환경적 스트레스로부터 세포를 보호한다. 대표적인 예로서, betaine 은 신장에서 뇨의 농축 시 발생하는 삼투압의 상승으로부터 세포를 보호하는 중요한 organic osmolyte 로 작용하며, 신장세포에서 뇨의 삼투압에 비례하여 증가한다 (Garcia-Perez and Burg, 1991). 또한 betaine 은 간의 macrophage 인 Kupffer cell 과 sinusoidal endothelial cell 의 organic osmolyte 로도 작용함이 확인되었다 (Horio et al., 2001; Weik et al., 1998; Zhang et al., 1996a; Zhang et al., 1996b). 세포로 수송된 betaine 은 세포의 기능

조절에 중요한 역할을 담당하는 것으로 제안되었으며, 실제로 삼투압 변화에 의한 Kupffer cell 의 활성화를 억제하였다 (Weik et al., 1998; Zhang et al., 1996a).

황 함유 아미노산에 대한 betaine 의 생리작용은 주로 간과 신장에서 homocysteine 에 methyl 기를 제공하며 methionine 을 합성함으로써, homocysteine 제거에 기여하게 된다. 황 함유 아미노산 대사에 있어서 homocysteine 의 대사는 중요한 조절단계에 위치한다. 즉, CBS 에 의한 cystathionine 의 합성은 비가역적으로 methionine 의 황을 cysteine 으로 전달하며, 반면 BHMT 와 MS 에 의한 methionine 의 합성은 methionine 의 황을 보존한다. Betaine 의 황 함유 아미노산에 대한 영향은 본 실험실에서 식수를 통해 3 주간 마우스에 betaine 을 공급한 실험모델을 통하여 연구되었다 (Kim and Kim, 2005). Betaine 의 투여에 의해 methionine 이 증가하였고, MAT 활성의 증가와 함께 SAM 과 SAH 모두 증가하였지만 SAM:SAH ratio 가 control 군에 비하여 증가하여 체내 methylation capacity 가 증가하였다. Homocysteine 농도는 저하되었고, CBS 활성화에는 영향을 미치지 않았다. Cysteine 생성의 전구체인 cystathionine 농도는 감소하였고, CDO 활성화와 간 및 혈액의 taurine 농도는 감소되어 cysteine 이 taurine 으로의 대사되는 경로는 억제되는 것으로 나타났다. Cysteine 농도와 cysteine 으로부터 GSH 가 합성되는 경로에는 영향을 미치지 않았다. 하지만 methionine cycle 과 transsulfuration reactions 에 일어나는 현저한 변화에도 불구하고 간의 cysteine 이나 GSH 농도에는 영향을 미치지 않았다. 그리고 같은 선행 연구에서 황 함유 아미노산 대사과정의 조절이 갖는 약리학적 의의를 확인하기 위해 betaine 투여 실험 모델에 간과 신장독성을 유발하는 물질인 chloroform 을 투여한 결과, betaine 의 투여는 chloroform 에 의한 간과 신장 독성을 현저하게 억제하였다 (Kim and Kim, 2005). 이 연구뿐만 아니라, 본 실험실 선행 연구에서 알코올, lipopolysaccharide, α -naphthylisothiocyanate, 그리고 dimethylnitrosamine 에 의해 유발된

간독성에 대해서도 betaine 투여에 의한 간 보호효과가 나타났다 (Kim & Kim, 2002; Kim et al., 2005; Kim et al., 2009; Jung et al., 2013). 그리고 3 주간 고지방 식이를 사용하여 비알코올성 지방간을 유발한 본 실험실 선행연구에서 betaine 의 투여는 methionine, SAM:SAH ratio 를 증가시켰고, 고지방식이에 의해 감소한 GSH 농도를 증시켰다. 고지방식이에 의하여 교란된 황함유 아미노산의 대사를 betaine 투여가 정상화함으로써 간에서 유발된 산화적 스트레스를 억제하였다 (Kwon et al., 2009). 위의 본 실험실 선행연구 결과는, 간손상 유발 동물실험모델에서 betaine 의 투여는 황함유 아미노산 대사를 개선시켜 간 보호효과를 나타냄을 암시한다. 따라서 betaine 대사과정에 대한 연구는 독성물질에 의한 betaine 의 간 보호효과를 규명하는 중요한 연구가 된다.

3. 3. 대사

Betaine 의 대사는 BHMT 에 의하여 매개되며 homocysteine 에 methyl 기를 전달한 후 dimethylglycine 으로 전환된다. 한편, homocysteine 에 methyl 기를 제공하는 반응은 MS 에 의해서도 매개된다. 이 반응은 5-methyltetrahydrofolate 의 methyl 기가 MS 에 의해 cobalamin (Vitamin B12) 에 전달되어 methylcobalamin 을 형성하고, 이후 homocysteine 에 methyl 기를 공급하게 된다. 설치류의 간에서 homocysteine 의 methylation 에 대한 작용은 BHMT 와 MS 가 서로 상호보완하는 것으로 보고되고 있으며, choline 결핍식이에 의하여 betaine 의 농도가 낮아지게 되면, 더 많은 양의 5-methyltetrahydrofolate 가 homocysteine 대사에 사용이 된다 (Varela-Moreiras et al., 1992). 반대로 folate 또는 cobalamin 결핍식이, 5-methylenetetrahydrofolate 를 5-methyltetrahydrofolate 로 전환시키는 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 가 유전적으로 결핍될 경우 BHMT 의 활성이 증가되어 homocysteine 의 methylation 에 대해

MS 와 상보적으로 작용한다. (Kim et al., 1994; Schwahn et al., 2003; Schwahn et al., 2004). 즉, folate 의 공급 감소로 인해 MS 의 활성이 감소되고, 따라서 증가된 homocysteine 의 제거를 위해 더 많은 betaine 이 소모됨을 의미한다.

BHMT 는 포유류의 간에 풍부하고, human, pig, guinea pig 의 신장에서도 발견되지만, 랫트의 신장에서는 극히 제한적으로 존재한다고 알려져 있다. 간에서 BHMT 의 활성은 betaine 과 choline 공급에 의하여 증가하며, dimethylglycine, methionine, SAM, 그리고 methylthioadenosine 등 에 의하여 그 활성이 억제되는 것으로 보고되었다 (Finkelstein et al., 1982a; Finkelstein et al., 1982b; Finkelstein et al., 1983; Finkelstein and Martin, 1984; Ou et al., 2007). 또한 hydrocortisone, cortisol, triamcinolone 과 같은 부신피질 호르몬 유사체에 의하여 BHMT 의 mRNA 및 활성이 증가되며, insulin 의 처리는 triamcinolone 에 의한 mRNA 발현 및 활성 증가를 억제하였다 (Jacobs et al., 1998; Wijekoon et al., 2005; Ratnam et al., 2006). 마우스에 만성적으로 알코올 식이를 투여하였을 때, BHMT 의 발현과 활성은 영향을 받지 않았지만, MS 의 발현 감소로 인해 hyperhomocysteinemia 가 관찰되었다 (Ji et al., 2004). 반면 랫트에서는 알코올 식이에 의해 BHMT 의 발현 및 활성이 증가되어 betaine 의 고갈을 유발하고, 이로 인해 homocysteine 의 농도가 증가하였다 (Finkelstein et al., 1974). 한편, 간경화 및 간암과 같은 만성 간질환에서는 BHMT 의 발현이 감소되며, 이에 따라 homocysteine 의 농도 증가를 야기하게 된다 (Avila et al., 2000).

Homocysteine 은 생체의 항산화체계에 관여하는 cysteine 과 GSH 처럼 내인성 thiol 로 분류되지만, 이들과는 달리 "bad thiol" 로 불리는 대사체이다 (Mato and Lu, 2005). 임상적으로나 동물실험에서 혈중 homocysteine 농도가 높은 상태인, hyperhomocysteinemia 일어난 상황에서 homocysteine 과 atherosclerosis, end-stage renal disease, neural

tube defects, 그리고 Alzheimer disease 와의 관련성이 밝혀지고 있으며, 간 손상과의 연관성 또한 활발히 연구되고 있다 (Refsum et al., 1998; Bostom and Lathrop, 1997; Eskes, 1998; Lehmann et al., 1999; Ji and Kaplowitz, 2003). 특히, homocysteine 에 의한 extracellular matrix 의 교란, oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress 와 proinflammatory factors 의 활성화가 주목되고 있다. Vascular smooth muscle cell, hepatocytes, HepG2 cells, hepatic stellate cells 등 다양한 세포주에서 homocysteine 은 activating protein-1 의 binding activity를 증가시켜 조직의 extracellular matrix homeostasis 에 관여하는 tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) 의 발현을 증가시키고, collagen 전구체의 발현을 증가시켰다 (Torres et al., 1999; Carcia-Tevijano et al., 2001). Extracellular matrix homeostasis 와 관련된 homocysteine 의 영향은 혈관벽세포나 간세포에서 조직의 변화를 가져와 homocysteine 에 의한 동맥경화 및 간경화의 중요한 기전으로 보인다. 또한 human aortic endothelial cell 에서 homocysteine 은 염증관련 지표인 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 과 interleukin-8 (IL-8) 을 증가시켜 동맥경화를 유발할 수 있음이 관찰되었다 (Poddar et al., 2001). 또한 염증 반응에 대한 homocysteine 의 영향은 동맥경화 동물모델인 apolipoprotein-E knockout 마우스에서 homocysteine 에 의한 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 의 증가에 의해 일어남이 보고되었다 (Hofmann et al., 2001). 따라서 homocysteine 증가는 이러한 반응들을 통하여 homocysteine 에 의하여 발생하는 여러 병변에 관련되어 있는 것으로 보이며, betaine 은 BHMT 를 통해 homocysteine 을 methionine 으로 대사촉진 시킴으로써 이러한 병변 치료에 이용될 수 있음을 시사한다. 하지만 hyperhomocysteinemia 에 의한 질병에서 betaine 투여에 의한 치료 또는 예방 효과는 아직까지 제한적이며, 많은 질병모델에서 연구가 필요한 상황이다.

3. 4. 비알코올성 지방간에 대한 betaine 의 영향

Betaine 은 간에서 지방축적을 억제함으로써 지방간 생성을 억제한다고 알려져 왔다. 당뇨유발 또는 정상적인 동물모델에서 고지방 식이에 의해 유발된 비알코올성 지방간이 betaine 또는 choline 의 투여에 의하여 억제됨이 보고되었다 (Best et al., 1932; Best et al., 1933). 그리고 betaine 투여는 랫트에서 liver cirrhosis 를 억제하는 결과를 보여주었다 (Webster, 1942; Best et al., 1969). 임상적으로, betaine 을 비알코올성 지방간 환자에 투여하였을 때, 위약 투약군에 비하여 hepatic steatosis 와 염증관련 지표가 개선되는 결과를 보여주었다 (Abdelmelek et al., 2001; Maglio et al., 2000). 본 실험실에서 고지방식이에 의한 비알코올성 지방간 유발모델에서 betaine 의 투여는 고지방 식이에 의하여 유발된 간내 지질 축적을 억제하였으며, peroxy radical 과 hydroxyl radical 에 대한 항산화 지표를 개선시켰다 (Kwon et al., 2009). 이러한 비알코올성 간손상에서 betaine 투여의 효과는 choline 소모 감소와 SAM 증가를 통한 phosphatidylcholine 합성증가를 통해 간에서 VLDL 배출을 증가시킴으로써 간내 지방축적을 억제하여 비알코올성 간손상을 억제하는 것으로 제안되어 왔다 (Yao and Vance, 1989). 이 결과와 같이 본 실험실 선행연구에서, 고지방식이에 의해 유발된 비알코올 지방간에서 betaine 의 투여는 혈중 phosphatidylcholine 을 증가 시켰고, VLDL 합성의 platform protein 으로서 역할을 하는 apolipoprotein B (ApoB) 의 간내 단백질 발현을 증가시켜 간에서의 지질배출을 촉진시켰다 (Ahn et al., 2015). 이 결과는 간에서의 지질배출증가가 betaine 에 의한 지방간 억제효과의 중요한 기전이 될 수 있음을 의미한다.

4. AMPK

Adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) 는 serine/threonine kinase 로서 체내 모든 조직에 존재하며, energy sensor 로서 작용하여 체내 대사 항상성 유지에 관여한다 (Carling, 2005; Steinberg et al., 2006; Hardie, 2007; Towler and Hardie, 2007). 구조적으로 AMPK 는 heterotrimer 구조를 가지고 있으며, catalytic subunit 인 alpha subunit 와 regulatory subunit 인 beta 와 gamma subunit 으로 구성되어 있다 (Xiao et al., 2007). 구조적으로 alpha catalytic subunit 에 의한 최적의 AMPK 활성화를 위해서 beta 와 gamma subunit 모두 필요하다 (Chen et al., 1999). 이렇게 3 가지 subunit 에 의해 각각 다양한 isoform (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 , γ_3) 이 발현 되어, 최대 12 종류의 heterotrimer 의 발현이 가능하며, 이 조합은 조직 특이적으로 발현된다고 알려져 있다 (Mahlpuu et al., 2004).

4. 1. AMPK 의 조절

AMPK 의 활성화는 catalytic subunit 인 alpha subunit 의 Thr-172 위치가 인산화 됨으로써 가장 크게 증가한다 (Oakhill et al., 2012). AMPK 의 alpha subunit 인산화는 직접적으로 AMPK 상위단계 인산화 효소에 의해 일어나며, adenosine monophosphate (AMP) 혹은 adenosine diphosphate (ADP) 에 의해 그 활성이 더욱 증가한다고 보고 되어있다 (Oakhill et al., 2010). 또한, AMP 혹은 ADP 는 gamma subunit 에 결합함으로써 AMPK 를 allosteric activation 시킬 수 있다 (Sanders et al., 2007; Oakhill et al., 2011; Xiao et al., 2011). AMP 와 ADP 의 gamma subunit 에 대한 결합은 AMPK 효소 구조의 변화를 일으켜 alpha subunit 의 Thr-172 인산기가 phosphatase 에 의하여 분해되는 것을 막아, AMPK 활성이 유지되도록 한다 (Sanders et al.,

2007; Oakhill et al., 2011). AMP 와 ADP 에 의한 alpha subunit 인산화는 beta subunit 의 myristoylation 과정이 필요하지만, allosteric activation 에는 beta subunit 의 myristoylation 과정이 필요하지 않음이 보고되었다 (Oakhill et al., 2010).

포유류에서 AMPK alpha subunit 의 Thr-172 위치를 인산화 시키는 upstream kinase 로서 liver kinase B1 (LKB1) 과 Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinase kinase (CaMKK) 가 알려져 있다. LKB1 은 거의 대부분 핵안에 존재하고, 소량만이 cytoplasm 에 존재한다고 알려져 있다 (Smith et al., 1999; Tiainen et al., 2002). LKB1 은 2 종류의 complex 를 형성할 수 있으며, complex 형성은 LKB1 의 안정성과 활성화에 영향을 준다. 먼저 STE20-related adaptor protein (STRAD), mouse protein 25 (MO25) 와 함께 heterotrimer 를 이룰 수 있다 (Hawley et al., 2003; Woods et al., 2003). STRAD 는 pseudokinase 로서 LKB1 의 핵에서 cytoplasm 으로의 이동을 유도하며, LKB1 의 활성을 증가시킬 수 있다. 반면 MO25 는 scaffolding protein 으로서 STRAD 에 결합하여, STRAD 와 LKB1 의 결합을 촉진하며, STRAD 에 의한 LKB1 의 활성을 증가를 유도할 수 있다 (Baas et al., 2003; Zeqiraj et al., 2009; Milburn et al., 2004). 또한 LKB1 은 heat shock protein 90 과 CDC37 과 complex 를 이루어 cytoplasm에서 안정화를 이룰 수 있다 (Nony et al., 2003; Boudeau et al., 2003). 최근 연구에서 LKB1 은 cAMP-dependent protein kinase (PKA), protein kinase C (PKC), ataxia telangiectasia mutated (ATM) 에 의해 인산화 되어 AMPK α subunit 에 대한 affinity 가 증가할 수 있다 (Collins et al., 2000; Xie et al., 2006; Sapkota et al., 2002). AMPK 의 activator 로 알려져 있는 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) 에 의한 AMPK activation 은 LKB1 를 통하여 일어나는 것으로 보고되었다 (Fisslthaler et al., 2009; Sutherland et al., 2003). LKB1 은 AMPK alpha2 subunit 을 한정적으로 인산화시키는 것으로 연구되었으며,

LKB1 의 결핍은 심근 세포와 골격근 세포에서 AMPK alpha2 의 활성을 억제하는 것으로 보고되었다 (Sakamoto et al., 2006).

LKB1 과는 달리, CaMKK 는 세포내 Ca^{2+} 의 농도에 영향을 받는다. Bradykinin 과 thrombin 과 같이 세포내 Ca^{2+} 의 농도를 증가시키는 자극은 CaMKK 활성화를 통하여 AMPK alpha2 를 활성화 시킨다고 보고되었다 (Hawley et al., 2005; Stahmann et al., 2006).

4. 2. AMPK 의 작용

AMPK 는 체내 “master metabolic switch” 로서 작용하여, 활성화되어 glycogen, fatty acid, cholesterol 을 합성하는 anabolic pathway 를 억제하고, glycolysis, fatty acid β -oxidation을 통하여 adenosine triphosphate (ATP) 를 생성하는 catabolic pathway 를 증가시키는 것으로 알려져 있다.

Glycogen 은 짧은 시간 에너지 저장형태로서 운동시에 근육조직이나 단식시에 간에서 중요한 에너지원으로서 사용된다. AMPK 는 glycogen synthase (GS) 의 inhibitory site 로 알려진 Ser-7 을 인산화하여 활성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 동물실험에서 간에서 glucose 생성이 AMPK 에 의하여 억제되었다 (Steinberg et al., 2009; Bergeron et al., 2001). 그리고 AMPK alpha2 knockout 마우스에서 hyperglycemia, glucose intolerance, 그리고 간에서 glucose 생성이 증가하였다 (Andreelli et al., 2006). L-type pyruvate kinase (L-PK), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), 그리고 glucose-6-phosphatase (G-6-P) 와 같은 gluconeogenesis 관련된 효소들의 전사가 AMPK 에 의하여 억제되었다 (da Silva Xavier et al., 2003; Lochhead et al., 2000; Woods et al., 2000).

Glucose 와 같은 즉시 이용 가능 한 에너지원이 고갈되었을 경우, lipid 는 생체 내 에너지원으로서 이용된다 (Kiens, 2006). 이때, AMPK

는 몇몇 기질들을 조절함으로써 지질대사에 영향을 미친다. 이중 ACC는 acetyl-CoA로부터 지방산 생성에 중요한 기질로 사용 되는 malonyl-CoA를 생성함으로써, 지방산 생성에 관여한다 (Sedgwick et al., 1977). 그리고 ACC 작용의 산물인 malonyl-CoA는 mitochondria에서 지방산 β -oxidation에 관여하는 효소인 carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)의 강력한 억제제로 알려져 있다 (McGarry et al., 1983). Malonyl-CoA는 CPT1의 억제를 통해 mitochondria로의 긴 사슬 지방산의 이동을 억제함으로써 지방산 β -oxidation을 억제하여 지방산 분해를 저하시키게 된다. 따라서 ACC의 불활성화는 지방산 생성의 기질인 malonyl-CoA 생성을 억제할 뿐만 아니라, mitochondria에서 지방산 분해를 억제하여 간에서 지방축적을 억제하게 된다. AMPK는 ACC의 Ser-79, Ser-1200, 그리고 Ser-1215부분을 인산화 함으로써 직접적으로 ACC를 불활성화 시킨다고 알려져 있으며, AMPK의 activator인 AICAR의 투여에 의해 ACC Ser-79 위치가 인산화됨이 보고되었다 (Munday et al., 1988; Davies et al., 1990; Corton et al., 1995). 따라서 AMPK는 ACC 불활성화를 통하여 직접적으로 지방산 합성을 억제할 뿐만 아니라, malonyl-CoA에 의한 지방산 산화억제를 저해함으로써 지질대사에 영향을 미치게 된다.

ACC와 함께 지방산 합성에 중요한 효소인 FAS와 glycerolipid 생성에 관여하는 GPAT에도 AMPK가 영향을 미치는 것으로 연구되었다. Glucose 투여에 의하여 증가한 FAS의 발현이 AICAR 투여에 의하여 저하되었다 (Foretz et al., 1998). 그리고 다른 실험 모델에서 hepatocyte에 대한 AICAR의 투여는 GPAT의 활성을 감소시키는 것으로 보고되었다 (Muoio et al., 1999). ACC, FAS, 그리고 GPAT는 전사인자인 sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)에 의하여 발현이 조절된다고 알려져 있다 (Jump et al., 2005; Kim et al., 1999; Horton et al., 2003). AMPK가 지속적으로 활성화된, 간세포에서 SREBP-1c의 발현이 억제되었다 (Foretz et al., 2005). 최근 insulin

resistance 유발 마우스 실험 모델에서 AMPK 가 SREBP-1 과 SREBP-2 를 직접적으로 인산화 시킴으로서 SREBP-1 과 SREBP-2 에 의한 전사를 억제한다는 보고가 있었다 (Li et al., 2011). 보고된 연구결과를 종합했을 때, 활성화된 AMPK 는 직접적으로 지방산 생성효소인 ACC 를 인산화 시키거나, 지방산/중성지방 합성효소의 전사인자인 SREBP-1c 를 인산화시켜 불활성화 시킴으로써 간에서 지질생성을 억제할수 있다. 따라서 AMPK 의 활성화에 대한 연구는 비알코올성 지방간 치료의 유망한 치료점이 될 수 있음을 시사한다.

5. 연구 목적

최근 본 실험실 선행연구에서, 고지방식이에 의해 유발된 비알코올성 지방간에서 betaine 의 투여는 간내 BHMT 의 단백질 발현을 증가시키고 homocysteine 농도를 저하시켰다 (Ahn et al., 2015). 또한 betaine 의 투여는 지질생성 효소의 전사인자로 알려져 있는 liver X receptor α (LXR α) 와 SREBP-1c 의 발현을 감소시켰으며, AMPK 와 ACC 의 인산화를 증가시켜 지질생성 경로를 억제하였다. 본 실험실 선행연구와 같은 맥락의 연구결과로서, 마우스에 high-sucrose 식이와 함께 betaine 을 투여한 실험모델에서 간내 homocysteine 의 농도는 high-sucrose 식이에 의하여 증가하였으며, betaine 병용투여에 의하여 감소하였다 (Song et al., 2007). High-sucrose 와 betaine 의 병용투여는 지질합성 전사인자인 SREBP-1 의 mRNA 발현과 지질합성 효소인 ACC 와 FAS 의 mRNA 발현을 감소시켰다. 또한 betaine 의 병용투여는 AMPK 와 ACC 의 인산화를 증가시켜 지질생성을 억제하는 결과를 보여 주었다. 이 연구 결과들은 비알코올성 지방간에 대한 betaine 의 효과는 그동안 제시되어 왔던 간에서의 지질배출 증가 뿐만 아니라, 간에서의 지질생성 억제와도 관련이 있음을 시사한다. 하지만 betaine 의 투여가 지질생성 경로에 미치는 영향은 그 연구가 제한적이며, 특히 AMPK 의 활성화에 대한 betaine 의 영향은 아직 그 기전이 밝혀지지 않았다.

한편 homocysteine 은 알코올성 지방간 실험모델에서 ER stress 증가를 통해 SREBP-1c 의 발현을 증가시킴으로써 지질생성에 관여하여 알코올성 지방간을 일으키는 것으로 보고되었다 (Ji and Kaplowitz, 2003). Betaine 의 투여는 homocysteine 대사에 관여함으로써 알코올성 지방간을 억제함이 보고되어 왔다. 하지만 그 외 간 내 지질생성에 대한 homocysteine 의 역할과 betaine 의 지방간 억제 기전은 그 연구가 제한적이다. 따라서 본 연구의 목적은 비알코올성 지방간 유발 동물모

텔에서 betaine 투여에 의한 homocysteine 의 농도변화와 연관하여, 지질생성 경로에 중요한 AMPK 활성화에 미치는 영향을 평가하는 것이다. 또한 동물실험 뿐만 아니라, hepatoma 세포주를 이용한 실험을 통하여 betaine 의 투여가 AMPK 활성화에 미치는 작용점을 규명하는 것이다.

실험 재료 및 방법

1. 실험재료

1. 1. 시약 및 화학물질

Betaine, DL-homocysteine, 1,1-dimethylbiguanide (metformin), hydroxylamine, sodium bicarbonate, ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA), sodium phosphate, Bradford reagent, Tween 20, 2-mercaptoethanol, bromophenol blue, tetramethylethylenediamine (TEMED), boric acid, ammonium phosphate, sodium acetate, dithiothreitol, sodium bicarbonate, glutathione, 7-Fluorobenzofurazan-4-sulfonic acid ammonium salt (SBD-F), naphthol blue black, folin-ciocalteu's phenol reagent, triglyceride reagent, free glycerol reagent, glycerol standard 는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 에서 구입하였다.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), new born calf serum, penicillin and streptomycin 은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) 에서 구입하였다.

Dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, Tris-acid, glycine 는 Amresco Inc. (Cochran Road Solon, OH, USA) 에서 구입하였다.

Hydrogen chloride (HCl) 는 Daejung Chemicals & Metals Co. (경기도 시흥시) 에서 구입하였다.

Ethanol, sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), chloroform, sodium hydroxide, perchloric acid, formaldehyde, acetic acid 는 Duksan Pure Chemical Co. (경기도 안산시)에서 구입하였다.

Skim milk, ammonium persulfate (APS), Bis/Acrylamide solution,

amido black, bovine serum albumin (BSA), nitrocellulose, sodium dodecyl sulfate (SDS) 는 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) 에서 구입하였다.

Cholesterol reagent, cholesterol standard 는 Randox Laboratories (Antrim, UK)에서 구입하였다.

ECL prime reagent, ECL plus reagent, Tris-base, RIPA buffer 는 reagent grade 또는 그 이상의 품질을 사용하였다.

High performance liquid chromatography (HPLC) 분석에 사용한 methanol 은 Burdick and Jackson 사 (Muskegon, MI, USA) 에서 HPLC grade 제품을 구입하였다. 그 외 실험에 사용한 모든 시약은 reagent grade 또는 그 이상의 품질을 사용하였다.

1. 2. 항체

Anti-cystathionine β synthase (CBS), methionine adenosyltransferase I/III (MAT I/III), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) polyclonal 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 에서 구입하였다. Anti-betaine homocysteine methyltransferase (BHMT) 항체는 Everest Biotech (Oxfordshire, UK) 에서 구입하였다. Anti-phosphorylated adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK), phosphorylated liver kinase B1 (LKB1), phosphorylated acetyl CoA carboxylase (ACC), and phosphorylated sterol regulated element binding protein-1c (SREBP-1c), β -actin 항체는 Cellsignaling Technology (Denver, CO, USA) 에서 구입하였다. 모든 1 차 항체는 5 % 의 BSA 에 적절한 비율로 희석하여 사용하였으며, 사용 후 4 °C 에 보관하였다. 각 항체의 희석 비율은 공급 회사의 datasheet 에 따랐다.

2 차 항체인 HRP conjugated goat anti-rabbit 은 Jackson Immuno

Research (West Grove, PA, USA) 에서, donkey anti-mouse, donkey anti-goat 는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 에서 구입하였다.

2. 동물 실험

2. 1. 비알코올성 지방간 유발 모델

실험 동물로 웅성 Spague-Dawley (SD) 랫트 (9주령, 243 - 272 g) 를 (주) 샘타코 (경기도 오산시) 에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용하기 전 1 주 이상 55 ± 5 % 의 습도, 22 ± 2 °C 의 온도 및 환기가 조절된 서울대학교 약학대학 141 동 동물실험 연구실에서 동물을 적응시켰으며 오전 7 시와 오후 7 시를 기준으로 12 시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다.

웅성 SD 랫트에게 Purina Korea (서울) 로부터 공급받은 control chow diet 와 Dyets Inc. (Bethlehem, PA, USA) 로부터 공급받은 methionine-choline deficient 식이 (MCD) (D518810, Figure 3) 를 3 주간 자유롭게 공급하였다. Betaine 은 1 % 농도로 식수로 자유롭게 투여하였다.

2. 2. 혈장의 분리

헤파린 처리된 syringe 를 사용하여 채혈한 후, 15,000 rpm 에서 40 초간 원심 분리한 상등액 (혈장) 을 -70 °C 이하로 유지되는 deep freezer (Model ULT-1490, REVCO, Asheville, NC, USA) 보관하였다. 이 샘플을 혈중 cholesterol 측정에 사용하였다.

DYET# 518810
Choline Deficient and Iron Supplemented L-Amino Acid Defined
Rat Diet without L-Methionine (as per fax of 10-16-01)

L-Arginine			12.7	
L-Histidine			3.4	
L-Lysine HCl			9.1	
L-Tyrosine			5.7	
L-Tryptophan			1.8	
L-Phenylalanine			7.3	
L-Methionine			0	
L-Cystine			3.7	
L-Threonine			4.6	
L-Leucine			10.5	
L-Isoleucine			6.1	
L-Valine			6.3	
Glycine			6.2	
L-Proline			7.6	
L-Glutamic Acid			28.9	
L-Alanine			5.1	
L-Aspartic Acid			15.8	
L-Serine			7.2	
	Kcal/gm	4	total L-AA*.....	142.00 568
Ingredient			gm/Kg	kcal/gm
Cornstarch	3.6		100	360
Dextrin	3.63		100	363
Sucrose	4		408.58	1634.32
Cellulose (401855)	0		50	0
Corn Oil	9		50	450
Salt Mix #200000	0.47		35	16.45
Sodium Bicarbonate	0		4.3	0
Vitamin Mix #3000	3.92		10	39.2
Primex	9		100	900
Ferric Citrate, U.S.P	0		0.12	0
			total.....	1000
			Kcal/Kg	4330.97

Figure 3. Composition of the MCD diet.

2. 3. 간의 S9 분획의 분리

마우스를 isoflurane 로 마취시키고 복강을 절개하여 적출된 간에 4 배 용량의 1.15 % KCl 을 가하여 약 1 분 20 초 정도 polytron (ULTRA-TURRAX T-25, IKA-Labortechnik, Germany) 로 분쇄한 후 4 °C, 10,000 g 에서 high speed centrifuge (Model J2-MC, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA) 로 30 분간 원심분리하고 상등액 (S9 fraction) 을 취하였으며 이 분획을 단백질 발현측정에 사용하였다. S9 분획은 실험 시까지 -70 °C 이하로 유지되는 deep freezer (Model ULT-1490, REVCO, Asheville, NC, USA) 보관하였다.

2. 4. Methionine 함량 측정

간에 3 ~ 4 배 용량의 1.15 % KCl 을 가하여 약 1 분 정도 polytron (ULTRA-TURRAX T-25, IKA-Labortechnik, Germany) 으로 분쇄한 후, 분쇄액과 methanol 을 1:3 의 비율로 잘 혼합한 후, 시료를 약 20,000 g 에서 10 분간 원심 분리하였다. 상등액을 증류수와 1:2 의 비율로 잘 혼합하여 이 시료를 분석시 까지 -70 °C 이하의 deep freezer 에 보관하였다. 정량을 위해 O-phthaldialdehyde (OPA) 을 이용하여 유도체화하였는데, 시료 40 ul 와 OPA 200 ul 를 1.5 ml tube에서 2 분간 반응시킨 후 역상 column 과 fluorometric 검출기 (FS-980 fluorescence detector, Applied Biosystem, Foster, CA, USA) 를 장착한 HPLC 로 측정하였다. 0.1 M sodium acetic acid (Solvent A; pH = 7.2) 와 methanol + tetrahydrofuran = 97 + 3 (v/v) (Solvent B) 을 이동상으로 사용하였으며 농도구배를 주기 위해 2 개의 pump (Jasco Model PU-980, Jasco Co., Tokyo, Japan) 를 이용하였다. 농도 구배는 Rajendra 의 방법 (1987) 을 약간 변화시켜 Solvent A 를 0 분에 90 %

로, 0 - 4 분에 84 % 로, 4 - 12 분에 84 % 로, 12 - 18 분에 78 % 로, 18 - 22 분에 78 % 로, 22 - 26 분에 70 % 로, 26 - 30 분에 70 % 로, 30 - 47 분에 53 % 로, 47 - 51 분에 53 % 로, 51 - 56 분에 30 % 로, 56 - 58 분에 0 % 로, 58 - 62 분에 0 % 로, 62 - 63 분에 90 % 로 변화시켰으며 온도 40 °C 에 유속은 1.0 ml/min 이었다.

2. 5. SAM 및 SAH 함량 측정

간에 3 ~ 4 배 용량의 1.15 % KCl 을 가하여 약 1 분 정도 polytron (ULTRA-TURRAX T-25, IKA-Labortechnik, Germany) 으로 분쇄한 후, 분쇄액에 1 M perchloric acid 를 1:1 의 비율로 가해 혼합한 후, 시료를 약 20,000 g 에서 10 분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 분석시 까지 -70 °C 이하의 deep freezer 에 보관하였다. SAM 과 SAH 의 분석을 위해 1-heptanesulfonic acid sodium salt 를 사용하여 ion pairings 를 시키고 역상 column 과 UV 검출기 (UV-975 UV/VIS detector, Jasco Co., Tokyo, Japan) 를 장착한 HPLC system 을 이용하였다 (She *et al.*, 1994). 이동상은 18 % methanol 을 함유하고 40 mM ammonium phosphate 와 8 mM 1-heptane- sulfonic acid sodium salt 로 구성되었으며 pH 를 3.0 으로 맞추고, column oven 을 이용하여 35 °C 에서 분석하였다.

2. 6. Homocysteine 함량 측정

Homocysteine 의 함량은 Nolin 등의 방법 (2007) 을 약간 변형한 방법으로 측정하였다. 간에 4 배 용량의 1.15 % KCl 을 가하여 약 1 분 20 초 정도 polytron (ULTRA-TURRAX T-25, IKA-Labortechnik, Germany) 로 분쇄한 후, 분쇄액 200 µl 와 10 mM dithiothreitol 200 µl 를 혼합하고 실온에서 30 분간 방치하여 시료에 포함된 homocystine 및

protein 결합형 homocysteine 을 환원시켰다. 이 용액과 2 mM EDTA 가 함유된 1 M HClO₄ 를 1:1 의 비율로 가해 혼합한 후, 시료를 약 20,000 g 에서 10 분간 원심 분리하였다. 상등액에 1.55 M NaOH 를 적당량 가해 pH 를 9.5 로 맞추고 7-Fluorobenzofurazan-4-sufonic acid ammonium salt (SBD-F) 를 첨가한 후, 차광된 상태에서 1 시간동안 60 °C 로 가열하여 반응시켜 유도체화 하였다. Symmetry C18 analytical column (4.6 x 150 mm, 3.5 µm particles, Waters Co., Milford, MA, USA) 이 장착된 HPLC 를 사용하여 30 °C, 유속 0.8 ml/min 으로 용액 중 homocysteine 을 분리하였으며 형광의 세기를 fluorescence detector (Ex. 385 nm, Em. 515 nm) 로 측정하였다. 이동상은 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.0) 을 A 로 methanol 을 B 로 사용하여 A 의 비율이 0 - 7 분 까지 100 %, 7 - 8 분 까지 25 % 로, 8 - 13 분 까지 25 %, 그리고 13 - 14.5 분까지 100 % 가 되도록 변화시켰다. Homocysteine 을 사용하여 표준검량선을 작성하고 시료 중의 농도를 구하였다.

2. 7. 단백질 함량 측정

단백질 총량은 Lowry 등 (1951) 의 방법으로 측정하였다. 시험관에 150 µl 의 단백질 희석액을 넣고 Lowry complex (2 % (w/v) Na₂CO₃ : 1 % (w/v) copper sulphate : 2 % (w/v) potassium sodium tartrate = 100 : 1 : 1) 750 µl 를 가하고 즉시 혼합했다. 10 분 후 75 µl 의 0.1 N folin-ciocalteau's phenol 시약을 가하고 즉시 혼합한 다음 30 분 후에 750 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 표준검량선은 bovine serum albumin (BSA) 을 이용하였으며 작성된 검량선으로부터 시료의 단백질 농도를 계산하였다. 이를 이용해 효소활성 측정 및 단백질 발현 측정에 적용하였다.

2. 8. 단백질 발현 측정

Laemmli 의 방법 (1970) 에 따라 각 분획의 단백질을 sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 하였다. 7.5 % separating gel 을 제조하기 위해 3.95 ml 의 증류수와 2.5 ml 의 1.5 M Tris 완충액 (pH 8.8) 및 3 ml 의 30 % acrylamide/bis 용액을 섞었다. 위의 용액에 즉시 조제한 10 % ammonium persulfate 60 μ l 와 TEMED 5 μ l 를 가하여 미리 준비된 gel 굳힘용 유리판 사이에 붓고 그 위에 증류수를 가하여 gel 표면을 고르게 한 후 약 1 시간 가량 방치하여 굳혔다. 12 % separating gel 은 7.5 % gel 의 조성 중 증류수는 2.85 ml, 30 % acrylamide/bis 용액은 4 ml 로 변화시켜 만들었다. Separating gel 이 굳은 후 gel 표면의 증류수를 조심스럽게 제거하였으며, 다음의 조성에 따라 stacking gel 을 가한 후 comb 을 꽂아 sample loading 준비를 하였다. Stacking gel 은 3.36 ml 의 증류수, 0.5 M Tris (pH 6.8) 1.5 ml, 30 % acrylamide/bis 용액 780 μ l, 10 % ammonium persulfate 45 μ l 와 TEMED 6 μ l 를 가해 제조하였다. 전기 영동할 시료는 sample dilution buffer (1 M Tris (pH 6.8) 2.5 ml, 80 % glycerol 5 ml, 20 % SDS 5 ml, 1 % bromophenol blue 0.2 ml, b-mercaptoethanol 2 ml 과 증류수 5.3 ml 포함) 를 가해 적절한 농도로 희석하고, 95 $^{\circ}$ C 에서 5 분간 가열하여 준비하였다. 준비된 gel 에 시료를 loading 한 후 running buffer (1 L 의 용액중에 Trizma base 3.04 g, glycine 14.42 g, 20 % SDS 5 ml 포함) 내에서 전기영동하였다. 전압은 stacking gel 에서 100 volts 가 되도록 하고, separating gel 에서는 160 volts 를 유지하였다. 전기영동이 끝난 후 80 volts 에서 2 시간 동안 gel 을 nitrocellulose (NC) 지에 전이하였다. 이때 사용한 transfer buffer 는 1 L 용액 중에 trizma base 3.04 g, glycine 14.42 g 및 200 ml 의 methanol 이 포함되었다. 전이가 끝난 NC 지는 단백질을 염색시키는 amido black 용액을 이용해 전이과정이 정상적으로 이루어

졌는지 확인하였으며, 5 % non-fat milk 용액에 담가 상온에서 1 시간 방치하여 비특이성 결합을 방지하고, 0.05 % Tween 20 을 함유한 Tris buffer (TBST) 로 3 회 이상 세척한 후 1 차 항체를 사용하여 4 °C 에서 하룻밤 방치하였다. 1 차 항체는 5 % bovine serum albumin 용액에 희석하였다. 다음날 5 % non-fat milk 용액으로 희석한 2차 항체로 상온에서 1 시간 동안 반응시킨 후 ECL chemiluminescence system (Amersham, Gaithersburg, MA, USA) 을 사용하여 발색하였다.

2. 9. 조직 중 중성지방 함량 측정

간에 4 배 용량의 1.15 % KCl 을 가하여 약 1 분 20 초 정도 polytron (ULTRA-TURRAX T-25, IKA-Labortechnik, Germany) 로 분쇄한 후, 분쇄액으로 부터 lipids 추출한 후 Sigma kit (No. TR0110) 을 이용하여 중성지방 함량을 측정하였다. 간 sample 100 μ l 에 CHCl_3 :MeOH (1:2) 375 μ l, CHCl_3 125 μ l, DW 125 μ l 를 첨가한 후, 충분히 혼합하였다. 실온에서 10 분간 1000 g 로 원심분리 하여, 아래쪽의 CHCl_3 층에서 조심스럽게 lipids 를 취하였다. 분리한 lipids 10 μ l 에 triglyceride reagent:free glycerol reagent 1:4 비율로 혼합한 용액을 1 ml 을 넣은 후, 37 °C에서 10 분간 반응 시킨 후, 540 nm에서 흡광도 측정을 하였다. Glycerol standard 용액을 동일한 방법으로 반응시켜 표준 검량선으로 사용하여, 함량을 구하였다.

2. 10. Oil red O staining

Optimum cutting temperature (O.C.T.) compound 에 고정되어 얼려진 조직을 10 μ M 두께로 -20 °C 에서 frozen section 후, Gum-sucrose 에 20 분간 담궈 지방을 완화시키고 100 % propylene glycol에서 5 분 동안 탈수시켰다. Oil red O 를 이용하여 60 °C에서 7

분 동안 염색한 후 85 % propylene glycol 에 3 분 동안 흡수하였으며, distilled water (DW) 로 20 회 정도 세척하였다. 희석된 Harri's hematoxylin 으로 2 분 동안 배경을 염색하였으며 잘 세척한 후 수용성 봉입제 (glycerin) 으로 봉입하였다. 현미경으로 관찰시 fat 은 붉은색을 띠며, 핵은 푸른색을 띈다.

2. 11. 혈액 중 total cholesterol 함량 측정

헤파린 처리된 syringe 를 사용하여 채혈한 후, 15,000 rpm 에서 40 초간 원심 분리한 상등액 (혈장) 을 Randox Laboratories (Antrim, UK) 의 cholesterol reagent kits (No. CH 201) 를 사용하여 측정하였다. 분리한 혈장 10 μ l 에 4-aminoantipyrine, phenol, peroxidase, cholesterol esterase, 그리고 cholesterol oxidase 가 포함된 reagent 를 1 ml 넣고 37 $^{\circ}$ C 에서 5 분간 반응시킨 후, 500 nm 에서 흡광도 측정하였다. Cholesterol standard 용액을 동일한 방법으로 반응시켜 표준 검량선으로 사용하여, 함량을 구하였다.

3. 세포 실험

3. 1. 세포 배양

Human hepatoma HepG2 cell line 과 rat hepatoma H4IIE cell line 을 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) 로 부터 구입하였다. HepG2 cell line 은 10 % fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin 을 함유하고 있는 Dulbecco's Modified Eagles medium (DMEM) 배지에 배양하였다. H4IIE cell line 은 10 % fetal bovine serum, 10 % new born calf serum, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin 을 함유하고

있는 Dulbecco's Modified Eagles medium (DMEM) 배지에 배양하였다. HepG2 와 H4IIE cell line 모두 5 % CO₂ 와 95 % 공기를 함유한 37 °C incubator 에서 배양하였다. 모든 실험에서 세포는 80 % 정도의 confluency 를 유지하였고, 20 cell passages 를 넘지 않았다.

3. 2. 세포의 total whole lysate 분획의 분리

50 mm plate 또는 100 mm cell culture plate 에 배양한 세포의 배지를 제거한 후, 세포를 PBS 로 2 회 이상 세척 후 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0.5 % sodium deoxycholic acid, 0.1 % SDS, 그리고 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride 를 함유하고 있는 lysis buffer (RIPA buffer) 를 100~200 µl 가하여 세포를 완전히 용해시켰다. 10000 g, 4 °C 에서 원심분리하여 얻은 상등액을 단백질 발현 분석의 시료로 사용하였다. 세포의 total whole lysate 는 실험 시까지 -70 °C 이하로 유지되는 deep freezer (Model ULT-1490, REVCO, Asheville, NC, USA) 보관하였다.

3. 3. 세포내 homocysteine 함량 측정

RIPA buffer를 사용하여 용해시킨 세포용액을 사용하여, 조직에서와 동일한 방법으로 세포내 homocysteine 을 측정하였다.

3. 4. 세포의 단백질 함량 측정

단백질 함량 측정은 Bradford reagent 를 사용하였다. 세포의 total whole lysate 10 µl 에, Bradford reagent 300 µl 를 가한 후 595 nm 에서 흡광도 측정하였다. 표준검량선은 bovine serum albumin (BSA) 을 이용하였으며 작성된 검량선으로부터 시료의 단백질 농도를 계산하였

다. 이를 이용해 세포내 homocysteine 농도 측정 및 단백질 발현 측정에 적용하였다.

3. 5. 세포내 단백질 발현 측정

조직에서의 단백질 발현 방법과 같은 방법을 사용하여 세포내 단백질 발현을 측정하였다.

4. 통계 처리

모든 실험 결과는 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 으로 표시하였으며, one-way analysis of variance (ANOVA) test 를 실시하였으며, 모든 실험군들 간의 비교를 위해 Newman-Keuls multiple range test 를, 대조군과 약물 처리군과의 비교를 위해서 Dunnett's multiple comparison test 를 실시하여 사후 검정하였다. 통계적인 유의성은 P 값이 0.05 미만인 경우를 기준으로 판정하였다.

결 과

PART I. MCD 식이 공급에 의한 지방간 생성과 betaine 의 영향

1. MCD 식이와 betaine 의 병용투여가 체중변화 및 간무게에 미치는 영향

랫트에 MCD 식이와 1 % betaine 을 식수로 3 주간 공급 후, 체중 변화 및 간 무게를 관찰하였다 (Table 1). 개체의 몸무게는 실험 시작시점에서는 모든 군에서 차이가 없었지만, 실험 종료시점에서는 MCD 식이군과 MCD 식이와 1 % betaine 병용투여 군에서 유의적인 감소를 보였다. 간 무게는 몸무게와 마찬가지로 MCD 식이군과 MCD 식이와 1 % betaine 병용투여 군에서 유의적인 감소를 보였지만, 몸무게에 대한 간무게의 비율은 차이가 없었다. Betaine 섭취량은 control 식이와 MCD 식이에 1 % betaine 병용투여 하였을 때, 두 군 사이에 차이가 없었고, 각각 1.0 g/kg/day 와 0.9 g/kg/day 이었다.

Table 1. Body weight, liver weight, liver weight/body weight, and betaine intake in the rats fed a control or MCD diet.

	NC	CB	MCD	MCDB
Starting weight (g)	262.2 ± 1.5	257.2 ± 8.1	256.7 ± 5.5	268.0 ± 3.0
Final weight (g)	366.5 ± 7.3 ^a	390.0 ± 10.9 ^a	219.0 ± 4.7 ^b	226.7 ± 3.8 ^b
Liver weight (g)	13.7 ± 0.6 ^a	14.3 ± 0.9 ^a	8.5 ± 0.2 ^b	8.5 ± 0.8 ^b
Liver weight /body weight (%)	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.8 ± 0.1	3.7 ± 0.1
Betaine intake (g/kg/day)	-	1.0 ± 0.3	-	0.9 ± 0.2

Rats were treated with four different diets. NC, control diet; CB, NC with 1 % betaine in drinking water; MCD, methionine-choline deficient diet; MCDB, MCD with 1 % betaine in drinking water. Each value represents the mean ± SEM for four rats. Values with different letters (a, b) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

2. MCD 식이와 betaine 의 병용투여가 간과 혈액의 지질에 미치는 영향

랫트에 대한 3 주간의 MCD 식이 투여는 간 내 중성지방의 농도를 control 식이군에 비해 6 배 가량 증가시켰다 (Figure 4). MCD 식이와 1 % betaine 병용투여는 NC, CB 군 보다 높은 중성지방의 농도를 보였지만, MCD 식이 단독 투여 군에 비하여 50 % 가량 중성지방 농도를 감소시켰다. 그리고 간 조직의 Oil red O 결과 또한 MCD 군에 비하여 MCDB 군에서 지질의 축적이 완화되었다 (Figure 5). 혈중 total cholesterol 은 chow 식이와 1 % betaine 병용투여에 의해 chow 식이 단독투여에 비해 증가하였다. 그리고 MCD 식이에 의하여 혈중 total cholesterol 은 감소하였으며, MCD 식이와 1 % betaine 병용투여에 의하여 회복되었다 (Figure 6).

3. MCD 식이와 betaine 의 병용투여가 간내 AMPK 활성화에 미치는 영향

간에서의 AMPK 의 인산화는 3 주간 MCD 식이 섭취에 의하여 감소하였으며, MCD 식이와 1 % betaine 의 병용투여에 의하여 control 수준으로 회복되었다. AMPK 에 의하여 인산화되는 ACC 와 SREBP-1c 의 인산화는 MCD 식이에 의하여 감소하였고, MCD 식이와 betaine 의 병용투여에 의하여 회복되었다. AMPK 의 상위단계 인산화 효소로 알려져 있는 LKB1의 인산화도 betaine 을 투여한 CB 군과 MCDB 군 모두에서 증가하였으며, MCD 식이에 의하여 감소하였다 (Figure 7).

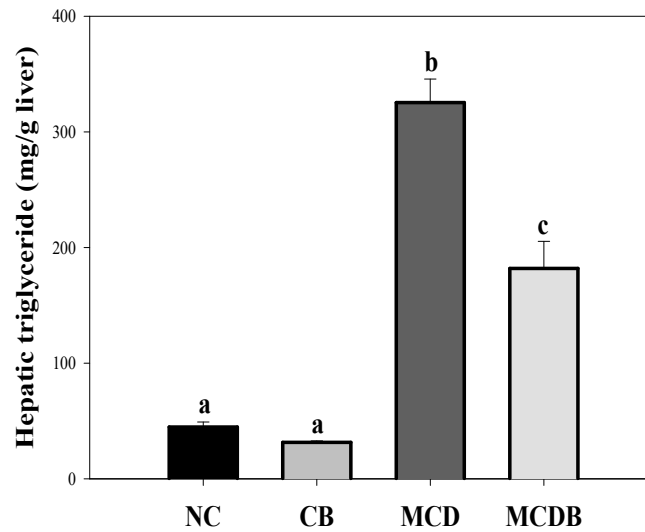


Figure 4. Hepatic triglyceride level in the rats fed MCD with betaine treatment.

Rats were treated with four different diets. NC, control diet; CB, NC with 1 % betaine in drinking water; MCD, methionine-choline deficient diet; MCDB, MCD with 1 % betaine in drinking water. Each value represents the mean \pm SEM for four rats. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.01$).

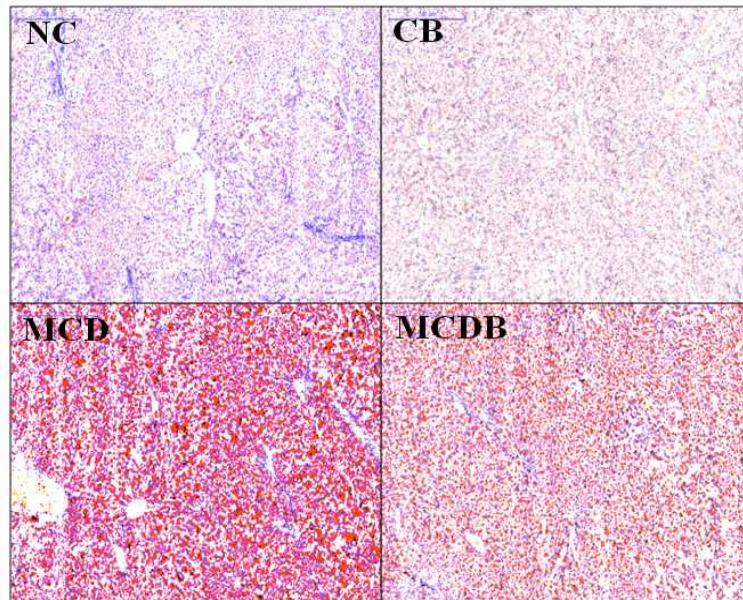


Figure 5. Histopathological examination of the liver. Oil Red O staining of liver sections.

Rats were treated with four different diets. NC, control diet; CB, NC with 1 % betaine in drinking water; MCD, methionine-choline deficient diet; MCDB, MCD with 1 % betaine in drinking water.

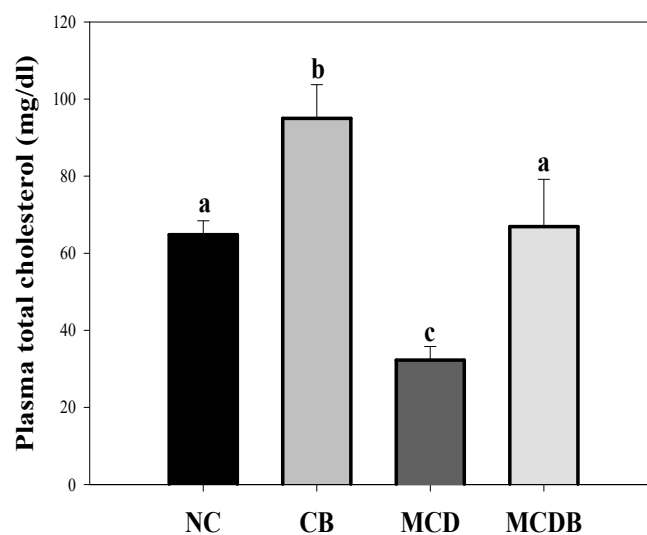


Figure 6. Plasma total cholesterol level in the rats fed MCD with betaine treatment.

Rats were treated with four different diets. NC, control diet; CB, NC with 1 % betaine in drinking water; MCD, methionine-choline deficient diet; MCDB, MCD with 1 % betaine in drinking water. Each value represents the mean \pm SEM for four rats. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.01$).

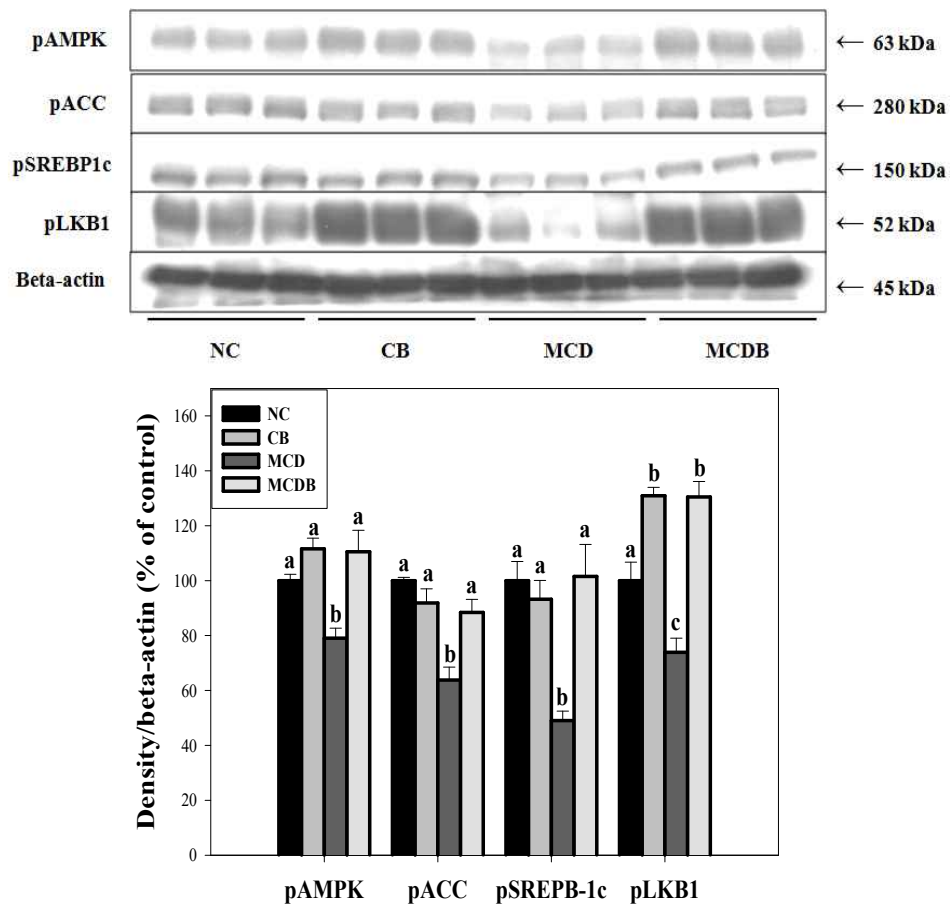


Figure 7. Hepatic expressions of pAMPK, pACC, pSREBP-1c, and pLKB1 in the rats fed MCD with betaine treatment.

Rats were treated with four different diets. NC, control diet; CB, NC with 1 % betaine in drinking water; MCD, methionine-choline deficient diet; MCDB, MCD with 1 % betaine in drinking water. Each value represents the mean \pm SEM for three rats. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.01$).

4. MCD 식이와 betaine 의 병용투여가 간내 황함유 아미노산 대사에 미치는 영향

간 내 methionine, SAM 그리고 SAH 의 농도는 3 주간 MCD 식이 투여에 의하여 control 식이에 비하여 유의적으로 감소하였다 (Table 2). Control 식이에 대한 1 % betaine 의 병용투여는 methionine 과 SAH 의 농도를 증가시켰지만, MCD 식이에 대한 1 % betaine 의 병용투여는 유의적인 변화를 일으키지 않았다. 간 내 SAM 의 농도는 control 식이와 MCD 식이에 대한 1 % betaine 의 병용투여에 의하여 유의적으로 증가하였다. 간에서 methionine 을 SAM 으로 대사시키는 효소인 MAT I/III 의 단백질 발현은 SAM 의 농도변화와 유사하게 control 식이와 MCD 식이에 1 % betaine 을 병용투여 하였을 때, 유의적으로 증가하였다 (Figure 8). 간 내 homocysteine 의 농도는 MCD 식이 3 주간 투여에 의하여 control 식이군에 비하여 2 배 이상 증가하였다. 그리고 control 식이와 MCD 식이에 대한 1 % betaine 의 병용투여는 간 내 homocysteine 농도를 유의적으로 감소시켰다. 간에서의 BHMT 단백질 발현은 control 식이 또는 MCD 식이와 1 % betaine 의 병용투여에 의하여 control 식이 단독투여군 보다 30 % 가량 증가하였다 (Figure 8). 반면 3 주간 MCD 식이 투여는 간에서의 BHMT 단백질 발현을 저하시켰다.

Table 2. Hepatic methionine, SAM, SAH, and homocysteine levels in the rats fed a control or MCD diet with betaine treatment.

	NC	CB	MCD	MCDB
Methionine (nmol/g liver)	228.9 ± 11.3 ^a	300.2 ± 23.8 ^b	153.2 ± 16.0 ^c	189.9 ± 3.5 ^{ac}
SAM (nmol/g liver)	128.6 ± 10.7 ^a	211.2 ± 34.3 ^b	52.7 ± 11.0 ^c	244.2 ± 49.7 ^b
SAH (nmol/g liver)	45.4 ± 3.7 ^a	69.1 ± 4.1 ^b	12.5 ± 0.6 ^c	15.6 ± 1.0 ^c
Homocysteine (nmol/g liver)	7.6 ± 1.2 ^a	2.8 ± 0.4 ^b	18.7 ± 1.0 ^c	3.0 ± 1.6 ^b

Rats were treated with four different diets. NC, control diet; CB, NC with 1 % betaine in drinking water; MCD, methionine-choline deficient diet; MCDB, MCD with 1 % betaine in drinking water. Each value represents the mean ± SEM for four rats. Values with different letters (a, b) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

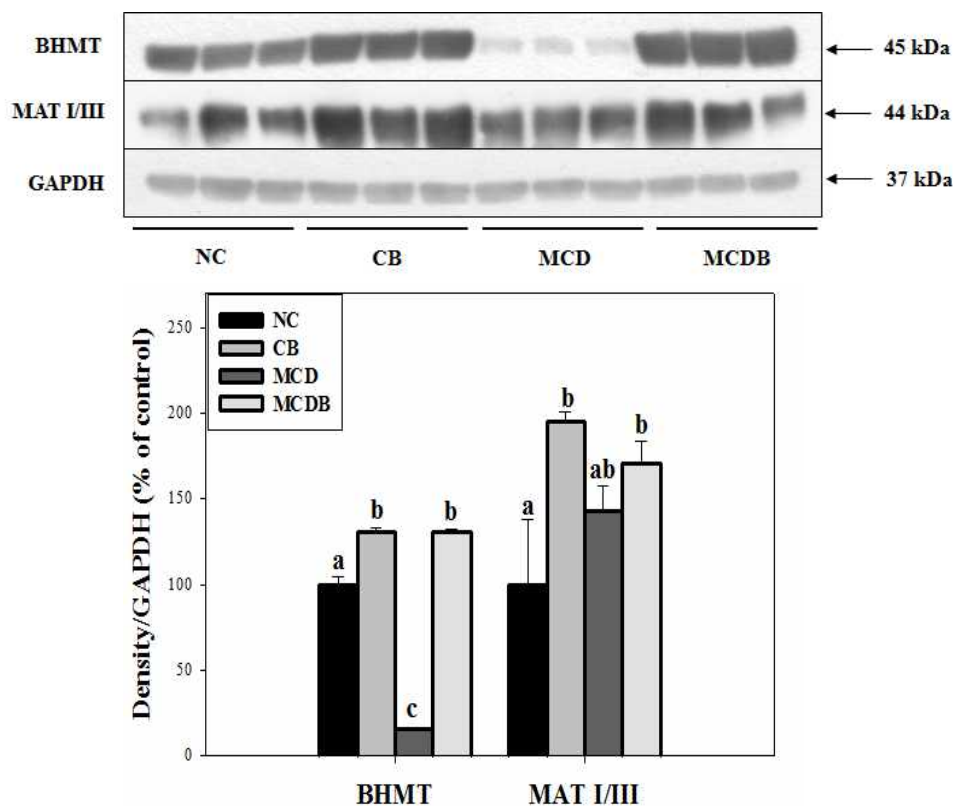


Figure 8. Hepatic expression of BHMT and MAT I/III in the rats fed MCD with betaine treatment.

Rats were treated with four different diets. NC, control diet; CB, NC with 1 % betaine in drinking water; MCD, methionine-choline deficient diet; MCDB, MCD with 1 % betaine in drinking water. Each value represents the mean \pm SEM for three rats. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

PART II. 간세포에서 AMPK 활성화에 대한 betaine 과 homocysteine 의 영향

1. HepG2 세포주 에서 AMPK 활성화에 대한 betaine 의 영향

Betaine 과 homocysteine 이 AMPK 활성화에 미치는 영향을 규명하고자, hepatoma 세포주를 사용하여 실험을 진행하였다. HepG2 세포주에 다양한 농도의 betaine (0.3, 1, 또는 3 mM) 을 처리하여 6 시간 동안 배양하였을 때, AMPK 의 인산화가 betaine 처리에 의하여 영향을 받지 않았다 (Figure 9). 그리고 betaine 의 처리는 ACC 와 SREBP-1c 의 인산화 와 LKB1 의 인산화에 영향을 미치지 않았다.

2. H4IIE 세포주 에서 AMPK 활성화에 대한 betaine 의 영향

HepG2 세포주에서 betaine 이 AMPK 활성화에 영향을 미치지 않았으므로, HepG2 세포주와는 달리 BHMT 효소가 존재한다고 알려져 있는 H4IIE 세포주를 실험에 사용하였다 (Schäfer et al., 2007). H4IIE cell line 에 다양한 농도의 betaine (0.3, 1, 또는 3 mM) 을 처리하여 6 시간 동안 배양하였을 때, AMPK 의 인산화가 betaine 1, 3 mM 처리에 의하여 증가하였다 (Figure 10). 그리고 ACC 와 SREBP-1c 의 인산화 역시 betaine 1, 3 mM 처리에 의하여 증가하였다. 하지만 betaine 의 처리는 LKB1 의 인산화에는 영향을 미치지 않았다. 또한 BHMT 의 단백질 발현이 betaine 처리에 의하여 증가하였고 (Figure 11), 세포내 homocysteine 의 농도는 betaine 1, 3 mM 처리에 의하여 감소하였다 (Figure 12).

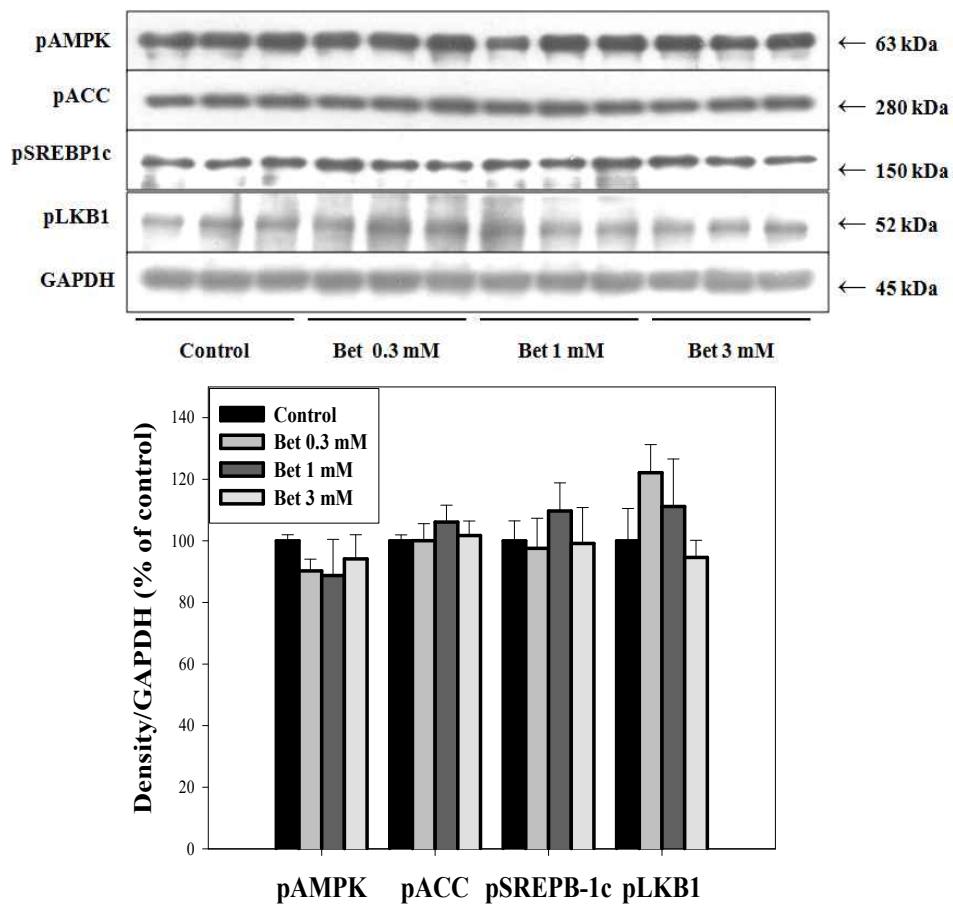


Figure 9. Effects of betaine on phosphorylation of AMPK, ACC, SREBP-1c, and LKB1 in HepG2 cells.

HepG2 cells were exposed to 0.3, 1, or 3 mM betaine (Bet) for 6 h. Each value represents the mean \pm SEM for three samples.

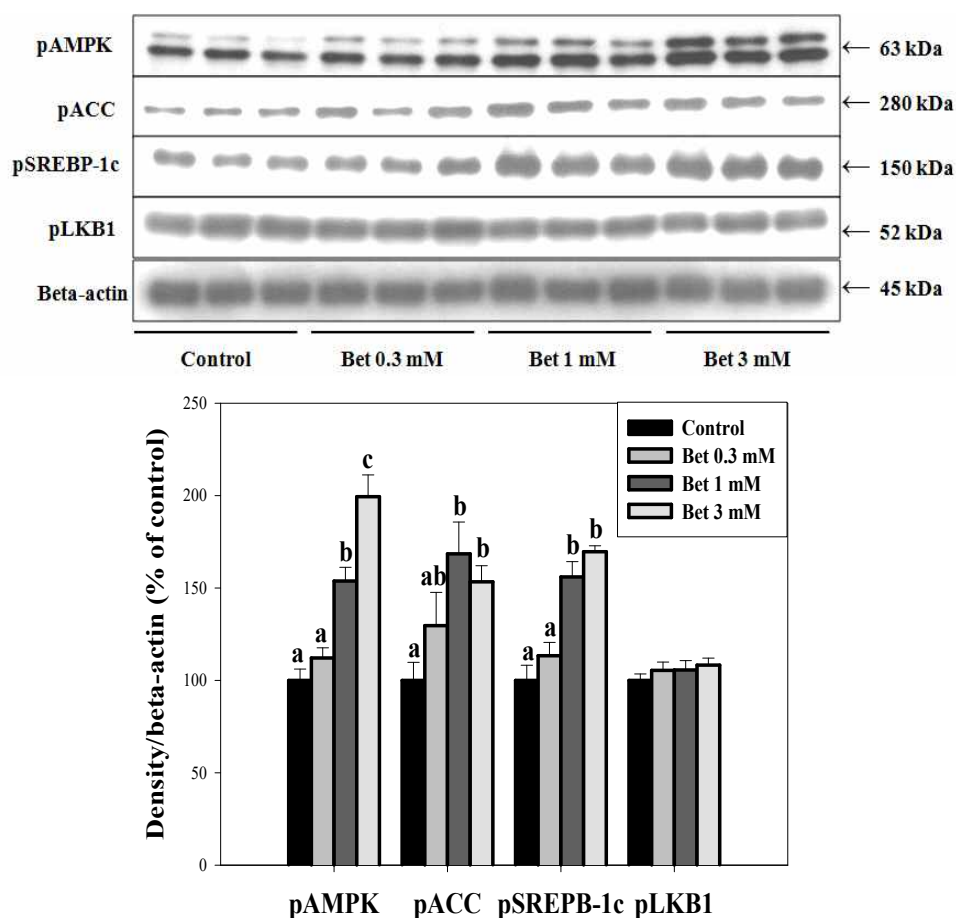


Figure 10. Effects of betaine on phosphorylation of AMPK, ACC, SREBP-1c, and LKB1 in H4IIE cells.

H4IIE cells were exposed to 0.3, 1, or 3 mM betaine (Bet) for 6 h. Each value represents the mean \pm SEM for three samples. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

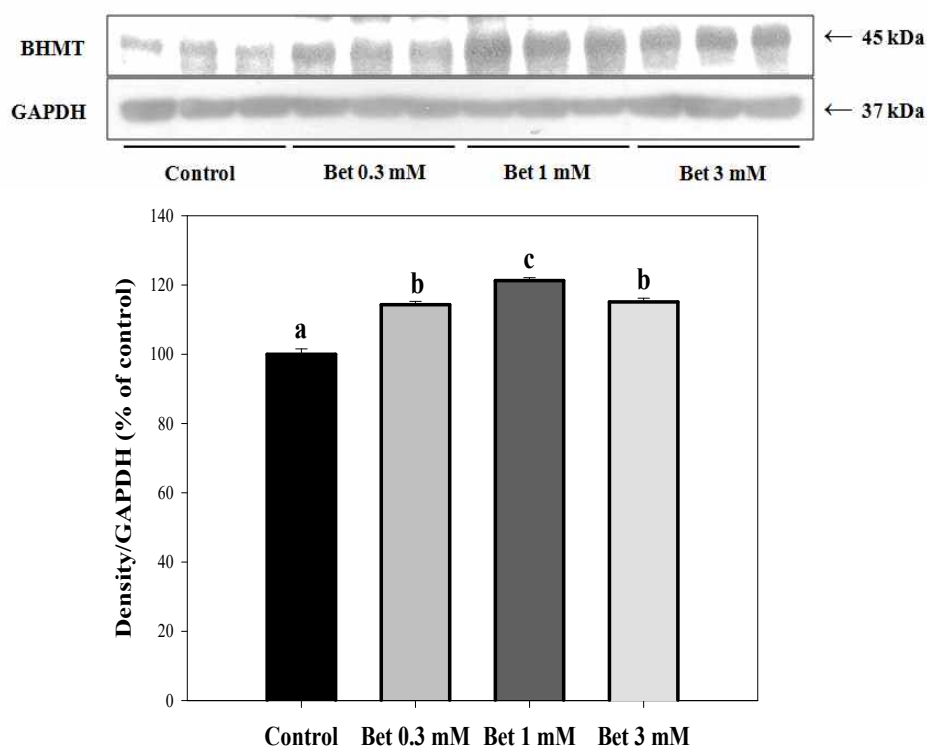


Figure 11. Effects of betaine on protein expression of BHMT in H4IIE cells.

H4IIE cells were exposed to 0.3, 1, or 3 mM betaine (Bet) for 6 h. Each value represents the mean \pm SEM for three samples. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

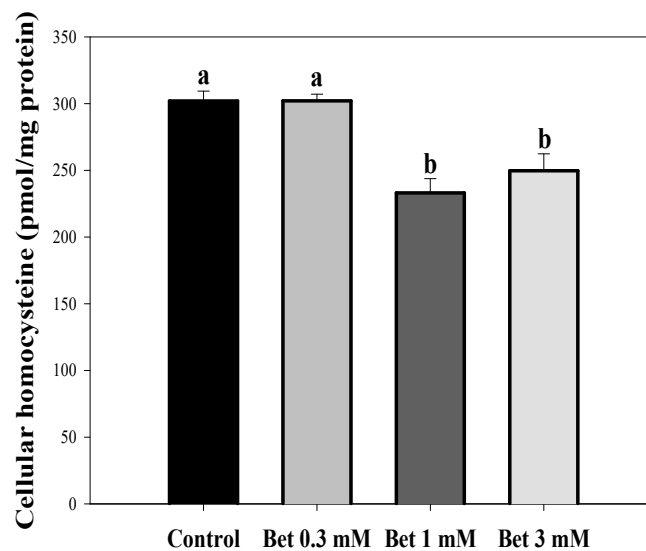


Figure 12. Effects of betaine on cellular homocysteine level in H4IIE cells.

H4IIE cells were exposed to 0.3, 1, or 3 mM betaine (Bet) for 6 h. Each value represents the mean \pm SEM for four samples. Values with different letters (a, b) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

3. H4IIE 세포주 에서 AMPK 활성화에 대한 homocysteine 의 영향

앞의 HepG2 세포주와 H4IIE 세포주에 betaine 처리한 실험결과를 통해 세포내 BHMT 발현에 의한 homocysteine 의 농도변화와 AMPK 활성화가 연관이 있는 것으로 판단되어, 다양한 농도의 homocysteine (10, 30, 또는 100 μ M) 을 HepG2 세포주에 6 시간 동안 처리하였다. AMPK 의 인산화는 30, 100 μ M homocysteine 의 처리에 의하여 감소하였다 (Figure 13). ACC 의 인산화 역시 30, 100 μ M homocysteine 의 처리에 의하여 감소하였으며, SREBP-1c 의 인산화는 homocysteine 처리에 의하여 농도 의존적으로 감소하였다. LKB1 의 인산화 또한 100 μ M homocysteine 의 처리에 의하여 감소하였다.

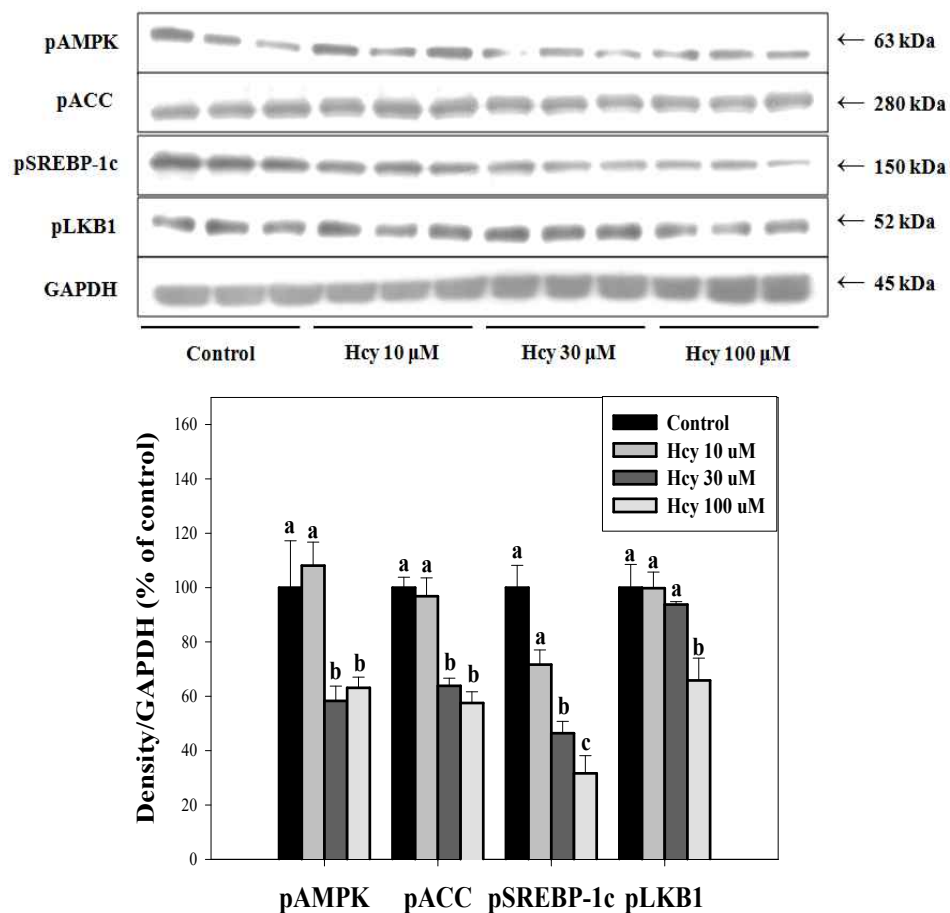


Figure 13. Effects of homocysteine on phosphorylation of AMPK, ACC, SREBP-1c, and LKB1 in HepG2 cells.

HepG2 cells were exposed to 10, 30, or 100 μ M homocysteine (Hcy) for 6 h. Each value represents the mean \pm SEM for three samples. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

4. HepG2 세포주 에서 AMPK activator 인 metformin 과 homocysteine 의 병용투여가 AMPK 활성화에 미치는 영향

AMPK activator 로 알려져 있는 metformin 과 homocysteine 을 HepG2 cell 에 병용처리 하여, AMPK 활성화에 대한 homocysteine 의 영향을 측정하였다. Metformin 2 mM 전처리에 의하여 AMPK 인산화가 증가하였고, 그에 따라서 ACC 와 SREBP-1c 의 인산화 역시 증가하였다 (Figure 14). 하지만 LKB1 의 인산화는 2 mM metformin 의 전처리에 의하여 영향을 받지 않았다. Metformin 전처리에 의하여 증가된 AMPK 와 ACC 의 인산화는 metformin 과 homocysteine 30 μ M 병용처리에 의하여 control 군과 같은 수준으로 감소하였다. SREBP-1c 의 인산화는 metformin 과 homocysteine 의 병용처리에 의하여 homocysteine 의 농도 의존적으로 감소하였다. LKB1 의 인산화는 metformin 과 homocysteine 30 μ M 병용처리에 의하여 유의적으로 감소하였다.

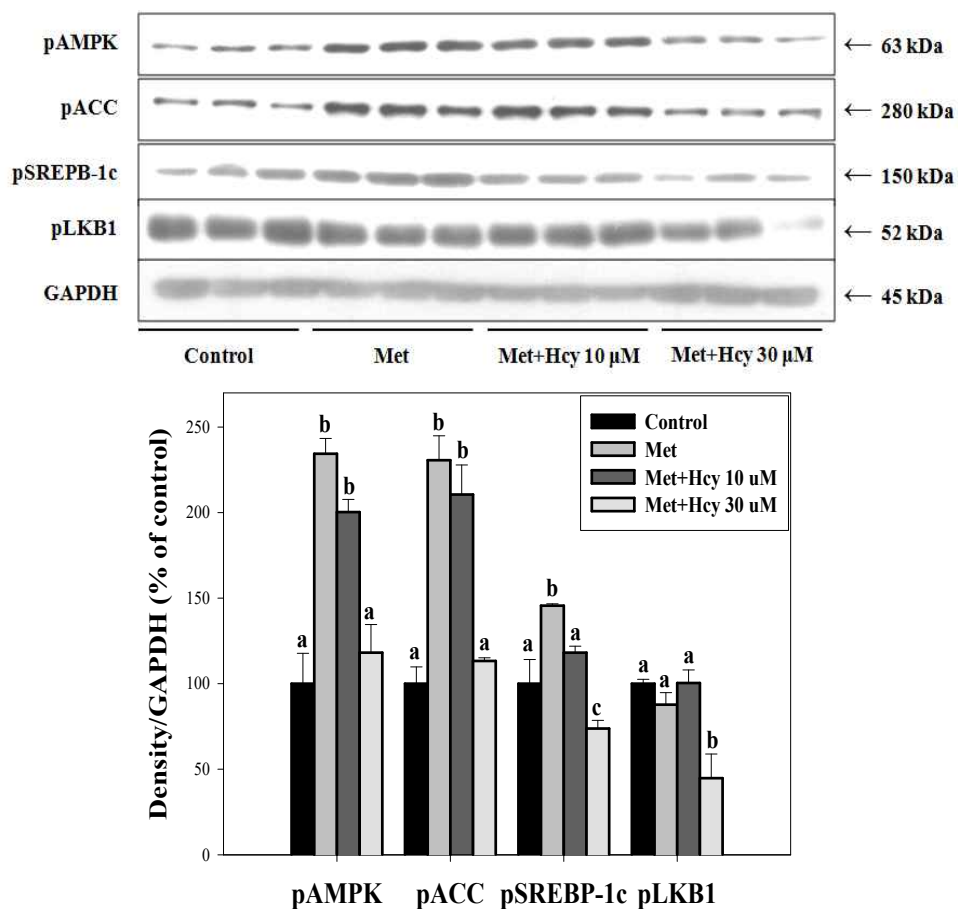


Figure 14. Effects of metformin and homocysteine on phosphorylation of AMPK, ACC, SREBP-1c, and LKB1 in HepG2 cells.

Cells were pretreated with 2 mM metformin (Met) for 30 min before homocysteine (Hcy) treatment at 10 or 30 μ M. HepG2 cells were incubated for 6 h after homocysteine treatment. Each value represents the mean \pm SEM for three samples. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

5. HepG2 세포주 에서 hydroxylamine (HA) 투여가 AMPK 활성화에 대한 영향

Homocysteine 농도변화가 AMPK 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 실험적으로 CBS inhibitor 로 사용되는 hydroxylamine (HA) 을 2 시간 동안 처리하였다 (Asimakopoulou et al., 2013). HA 1 mM 처리에 의하여 CBS 단백질 발현이 감소하였으며 (Figure 15), 세포내 homocysteine 의 농도가 증가하였다 (Figure 16). Hydroxylamine 에 의한 CBS 활성 감소는 보고가 되었지만, CBS 의 단백질 발현은 보고된 바가 없었다. 또한 hydroxylamine 처리에 의해 세포내 homocysteine 농도변화는 보고된 바가 없었다. 본 실험결과는 세포에 대한 hydroxylamine 의 처리가 CBS 단백질 발현에 영향을 줄 수 있으며, 그에 따라 homocysteine 농도를 증가시킬 수 있음을 보여준다. HA 0.3, 1 mM 처리는 AMPK 인산화를 감소시켰으며, HA 1 mM 처리에 의하여 ACC 와 SREBP-1c 의 인산화가 감소하였다. 하지만 HA 처리에 의해 LKB1 인산화는 영향을 받지 않았다 (Figure 17).

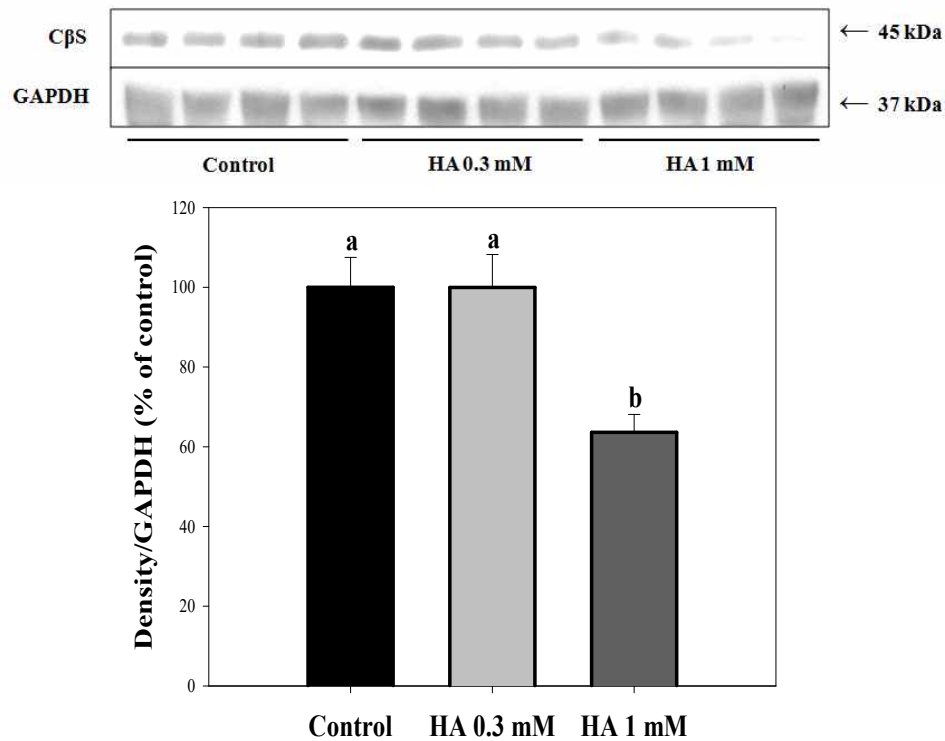


Figure 15. Effects of hydroxylamine (HA) on protein expression of CβS in HepG2 cells.

HepG2 cells were exposed to HA (0.3 or 1 mM) for 2 h. Each value represents the mean \pm SEM for three samples. Values with different letters (a, b) are significantly different from each other (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

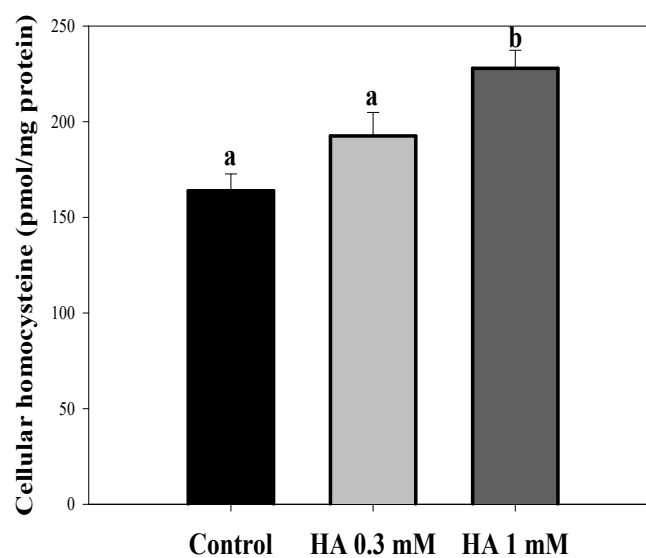


Figure 16. Effects of hydroxylamine (HA) on cellular homocysteine level in HepG2 cells.

HepG2 cells were exposed to HA (0.3 or 1 mM) for 2 h. Each value represents the mean \pm SEM for four samples. Values with different letters (a, b) are significantly different from each other (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

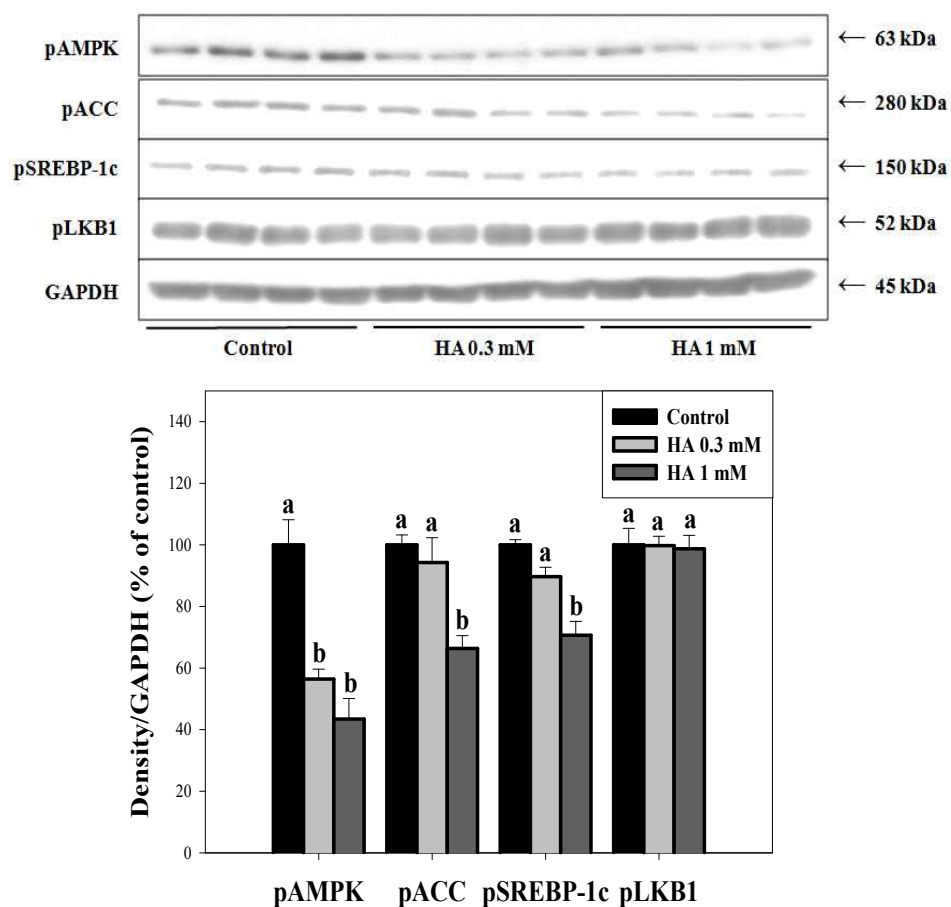


Figure 17. Effects of hydroxylamine (HA) on phosphorylation of AMPK, ACC, SREBP-1c, and LKB1 in HepG2 cells.

HepG2 cells were exposed to HA (0.3 or 1 mM) for 2 h. Each value represents the mean \pm SEM for three samples. Values with different letters (a, b) are significantly different from each other (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

6. H4IIE 세포주 에서 homocysteine 과 betaine 의 병용투여가 AMPK 활성화에 미치는 영향

Homocysteine 과 betaine 의 병용투여에 의해 AMPK 활성화가 어떠한 영향을 받는지 살펴 보기 위하여, H4IIE 세포주에 homocysteine 을 30 분 전처리 후, betaine 을 6 시간 동안 병용처리하였다. H4IIE 세포주에 대한 homocysteine 100 μ M 처리는 HepG2 세포주에 대한 실험결과와 마찬가지로 AMPK, ACC, SREBP-1c, 그리고 LKB1 의 인산화를 감소시켰다 (Figure 18). Homocysteine 전처리에 의해 감소된 AMPK 의 인산화는 homocysteine 과 betaine 3 mM 병용처리에 의하여 control 수준으로 회복되었다. ACC 의 인산화는 homocysteine 전처리에 의해 감소하였고, homocysteine 과 betaine 1, 3 mM 병용처리에 의하여 control 수준으로 회복되었다. Homocysteine 전처리에 의해 감소된 SREBP-1c 의 인산화는 homocysteine 과 betaine 1, 3 mM 병용처리에 의해서 control 군보다 증가하였다. LKB1 의 인산화는 homocysteine 전처리에 의하여 감소하였으며, homocysteine 과 betaine 1, 3 mM 병용처리에 의하여 control 군보다 증가하였다. 세포 내 homocysteine 의 농도는 homocysteine 전처리에 의하여 증가하고, homocysteine 과 betaine 병용처리에 의하여 control 수준으로 낮아졌다 (Figure 19). 그리고 BHMT 의 단백질 발현은 homocysteine 100 μ M 전처리에 의하여 유의적으로 감소하였고, homocysteine 과 betaine 병용처리에 의하여 control 수준으로 회복되었다 (Figure 20).

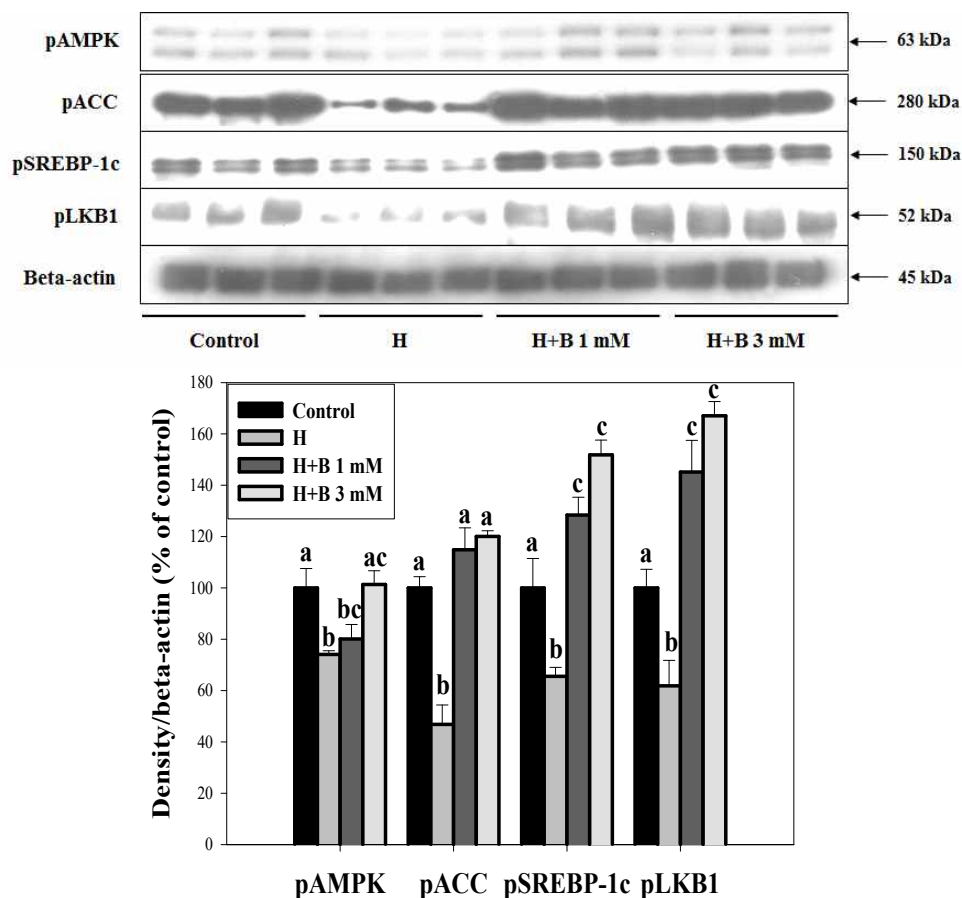


Figure 18. Changes in activation of the AMPK pathway in H4IIE cells treated with homocysteine and/or betaine.

Cells were pretreated with 100 μ M homocysteine (H) for 30 min before betaine (B) treatment. H4IIE cells were incubated for 6 h after betaine treatment. Each value represents the mean \pm SEM for three samples. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

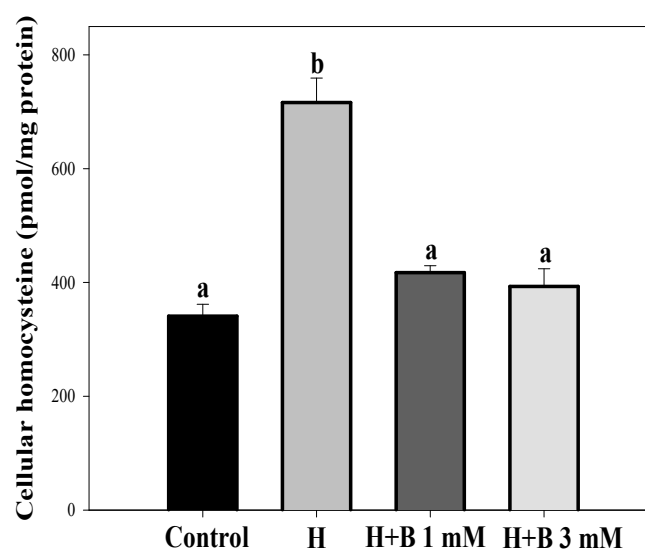


Figure 19. Changes in the cellular homocysteine level in H4IIE cells treated with homocysteine and/or betaine.

Cells were pretreated with 100 μ M homocysteine (H) for 30 min before betaine (B) treatment. H4IIE cells were incubated for 6 h after betaine treatment. Each value represents the mean \pm SEM for four samples. Values with different letters (a, b) are significantly different from each other (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

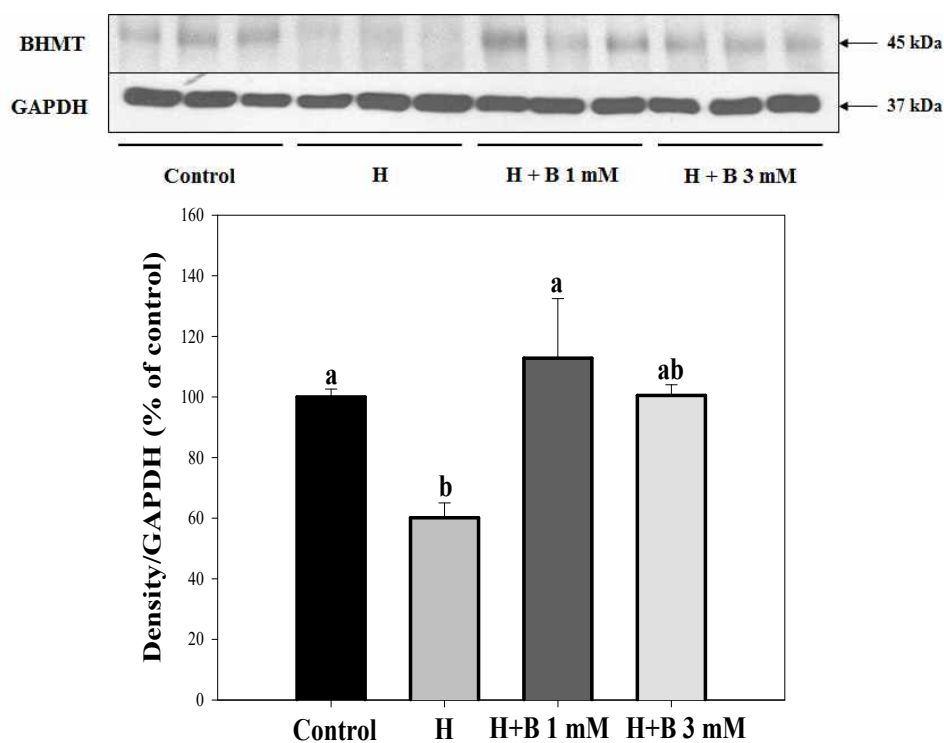


Figure 20. Changes in the protein expression of BHMT in H4IIE cells treated with homocysteine and/or betaine.

Cells were pretreated with 100 μ M homocysteine (H) for 30 min before betaine (B) treatment. H4IIE cells were incubated for 6 h after betaine treatment. Each value represents the mean \pm SEM for three samples. Values with different letters (a, b) are significantly different from each other (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

고 찰

본 실험에서 대표적인 비알코올성 지방간 유발 식이로 알려져 있는, MCD 식이에 1 % betaine 을 식수로 3 주간 병용투여하여 비알코올성 지방간에 대한 betaine 의 지방간 억제효과를 연구하였다. 랫트에 MCD 식이 3 주간 투여는 간에서 지질의 축적을 증가시키며, 혈중 total cholesterol 은 감소시켜 지질 대사를 교란하였다. 그리고 MCD 식이에 대한 1 % betaine 병용 투여는 간에서 MCD 식이에 의해 증가된 지질의 축적을 완화시켰다. 혈중 total cholesterol 농도는 MCD 식이 공급에 의하여 저하되었으며, MCD 식이와 betaine 병용투여에 의하여 정상수준으로 회복되었다. 이 결과는 betaine 의 투여가 MCD 식이에 의해 교란된 간에서의 지질배출 경로를 정상화 시키는 효과가 있음을 보여주었다. 대표적인 비알코올성 지방간 유발 실험모델인 MCD 식이의 투여는, methionine 과 choline 의 결핍으로 인해 간에서 VLDL 의 주요한 구성 성분인 phosphatidylcholine 의 농도저하가 일어나게 되어 간에서의 지질배출이 저하됨으로써 비알코올성 지방간을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Lomvardi et al., 1968; Ghoshal, 1995; Veteläinen et al., 2007). 따라서 이 결과들은 betaine 의 투여가 간에서 VLDL 합성에 영향을 주어, 간에서의 지질의 배출을 증가시켜 간 내 지질축적을 억제할 수 있음을 보여준다. 이 결과는 최근 본 연구자에 의해 보고된 고지방식이에 의해 교란된 지질배출 억제가 betaine 투여에 의하여 회복된 결과와 일치한다 (Ahn et al., 2015).

간에서 지질배출 형태인 VLDL 의 합성에 중요한 구성 요소인 phosphatidylcholine 의 합성은 간 내 황함유 대사와 연관이 있음이 알코올성 지방간 실험모델에서 여러 연구자에 의해 보고되었다. 만성적인 ethanol 의 투여는 SAM 과 SAM:SAH 의 비율을 낮춤으로서 간에서 PEMT 의 활성을 감소시켜 phosphatidylcholine 의 합성이 감소하게 되지만, betaine 의 투여는 PEMT 의 활성증가를 통해

phosphatidylcholine 생성을 증가시켜 간에서의 지질 배출이 증가되는 것으로 보인다 (Jung et al., 2013; Kharbanda, 2007; Kharbanda, et al., 2009). 알코올성 지방간에서의 연구뿐만 아니라, 최근 고지방식이에 의해 유발된 비알코올성 지방간 모델에서 betaine 의 투여가 혈액과 간에서 phosphatidylcholine 의 농도와 혈액에서의 VLDL 의 농도를 증가시키는 결과가 보고되었다 (Xu et al., 2015). 이 결과는 고지방 식이를 이용하여 비알코올성 지방간을 유발시킨 본 실험실 선행 연구에서, betaine 의 투여에 의해 VLDL 의 주요한 구성요소인 혈중 phosphatidylcholine 과 total cholesterol 이 증가한 결과와 일치하였다 (Ahn et al., 2015). 같은 연구에서 고지방 식이에 대한 betaine 의 투여는 phosphatidylcholine 뿐 만 아니라, 간에서 VLDL 형성 시 platform protein 역할을 하는 ApoB 의 단백질 발현을 증가시켰다. 본 실험실 선행연구뿐만 아니라, hepatoma 세포주 중의 하나인 McArdleRH-7777 세포에 BHMT 를 transfection 시킨 실험모델과 methionine 결핍 식이를 사용한 실험모델에서 betaine 의 투여는 BHMT 발현과 ApoB mRNA 발현을 증가시켜 간 세포내 지질축적을 억제하는 것으로 보고되었다 (Sowden et al., 1999; Sparks et al., 2006). 결과적으로 betaine 의 투여는 VLDL 합성에 주요한 요소인 phosphatidylcholine 과 ApoB 의 합성 증가를 통하여 간내 지질 축적을 억제하는 것으로 사료된다.

본 실험 결과에서 MCD 식이에 대한 betaine 의 병용투여는 지질배출 뿐만 아니라, 지질생성 경로에도 영향을 주었음을 확인하였다. 3 주간 MCD 식이투여는 AMPK 의 활성화를 감소시켰으며, AMPK 에 의한 ACC 와 SREBP-1c 의 억제효과를 감소시켰다. 이 결과는 MCD 식이 공급은 AMPK, ACC, 그리고 SREBP-1c 의 활성을 변화시켜 간에서 지질합성의 증가를 유발할 수 있음을 의미한다. 하지만 MCD 식이에 의해 유발된 비알코올성 지방간 유발모델에서 MCD 식이에 의한 지질배출 억제효과는 활발히 연구되었지만, 지질합성 경로에 대한 MCD 식이의 영향을 보고한 연구는 제한적이다. 최근 연구에서 MCD 식이의 투여에

의해 간에서 지질생성 효소로 알려져 있는 ACC, FAS, GPAT, 그리고 DGAT2 의 mRNA 발현이 증가함이 보고되었으며, AMPK 의 인산화가 감소함이 보고되었다 (Park et al., 2011; Tang et al., 2015). 따라서 MCD 식이 공급은 지질생성 효소들의 발현에 영향을 가짐으로써 지방간을 생성을 증가시킬 수 있는 것으로 보인다. 그리고 본 실험에서 MCD 식이와 betaine 의 병용투여는 MCD 식이에 의하여 감소하였던 AMPK 의 활성화를 증가시키고, ACC 와 SREBP-1c 의 불활성화를 증가시켰다. 이 결과는 MCD 식이에 대한 betaine 의 투여가 간에서의 지질배출 증가뿐만 아니라, MCD 식이에 의해 증가된 지질생성 경로를 저해하여 지방간 생성을 억제할 수 있음을 의미한다.

한편 간 내 methionine 과 SAM 의 농도는 MCD 식이 공급에 의하여 감소하였지만, homocysteine 의 농도는 반대로 MCD 식이에 의하여 증가하였다. Betaine 투여는 SAM 의 농도를 증가시키고, homocysteine 의 농도저하를 일으켰다. Methionine, SAM 그리고 homocysteine 의 농도변화에 관여하는, MAT I/III 와 BHMT 의 단백질 발현은 MCD 식이와 betaine 병용투여에 의하여 증가하였다. MCD 식이투여 모델에서 간 내 homocysteine 농도조절은 아직까지 보고된 바가 없었다. 하지만 유사한 연구로서 MCD 식이와 choline deficient 식이에서 간내 SAM 과 SAM:SAH ratio 의 감소를 확인한 연구가 있었으며, methionine 결핍에 의한 간내 homocysteine 농도증가가 보고된바있다 (Igolnikov and Green. 2006; Zeisel et al., 1989; Aissa et al., 2014). 본 실험 결과와 함께 위 실험결과들은 MCD 식이의 투여는 간 내 황함유 아미노산 대사를 교란시켜 homocysteine 의 농도에 영향을 줄 수 있음을 강력하게 시사한다. 그리고 3 주간 MCD 식이 공급모델을 통해 확인한, betaine 에 의한 간 내 AMPK 의 인산화, BHMT 단백질 발현 그리고 homocysteine 의 농도에 대한 영향은 본 실험실 선행연구인 고지방 식이에 의해 유발된 비알콜성 지방간 실험모델에서 확인한 결과와 일치하였다 (Ahn et al., 2015). 또한 최근 보고에서 BHMT knockout 마우스의

간과 혈액에서 정상 마우스보다 homocysteine 농도는 증가하였으며, 간에서는 지질축적이 일어남이 보고되었다 (Teng et al., 2011). 그리고 BHMT 를 과발현 시킨 transgenic 마우스 모델에서, high-methionine low-folate (HMLF) 식이를 이용하여 비알코올성 지방간을 일으켰을 때, 정상적인 마우스에 비하여 BHMT 를 과발현시킨 transgenic 마우스에서 간 내 지질축적이 억제되었다 (Ji et al., 2008). 따라서 MCD 혹은 고지방 식이에 대한 betaine 의 병용투여 실험결과와 BHMT 유전자 변형 동물모델 실험결과는 BHMT 작용과 지방간 생성이 연관이 있음을 암시한다. 또한 BHMT 의 작용은 간 내 homocysteine 농도변화와 직접적인 연관을 가지기 때문에 betaine 에 의한 지방간 억제 효과에서 BHMT 의 작용과 homocysteine 의 농도변화가 중요한 작용점이 될 수 있음을 시사한다.

Betaine 이 BHMT 발현과 homocysteine 농도에 미치는 영향을 바탕으로 betaine 의 지질생성 억제효과에 대한 영향을 연구하기 위하여 hepatoma 세포주를 사용하여 세포실험을 진행하였다. 세포실험 결과, HepG 세포주에 대한 betaine 의 단독처리는 AMPK 활성화에 아무런 영향을 미치지 못하였지만, HepG2 세포주와는 달리 BHMT 효소가 존재하는 H4IIE 세포주에서는 AMPK 활성화를 증가시켰다. 또한 HepG2 세포주에 대한 homocysteine 의 투여는 AMPK 의 활성화를 감소시키고, ACC 와 SREBP-1c 를 인산화를 감소시켜 불활성화를 억제하였다. C β S inhibitor 인 hydroxylamine (HA) 투여에 의해 세포내 homocysteine 농도는 증가하였을 때, AMPK, ACC, 그리고 SREBP-1c 의 인산화는 억제되었다. 활성화 된 AMPK 에 대한 homocysteine 의 영향을 측정하기 위하여, metformin 을 전처리 한 실험에서 AMPK, ACC, 그리고 SREBP-1c 의 인산화는 metformin 전처리에 의하여 증가하였다. 증가한 AMPK, ACC, 그리고 SREBP-1c 의 인산화는 metformin 과 homocysteine 병용처리에 의하여 감소하였다. 이 결과들은 세포내 homocysteine 농도의 증가가 AMPK 활성화를 억제하며 AMPK 하위단

계 효소들의 인산화를 감소시켜 세포내 지질생성 경로를 증가시킬 수 있음을 시사한다.

Homocysteine 은 간에서 SAM 의 methylation 산물인 SAH 가 SAH hydrolase 의 작용에 의하여 가역적으로 가수분해됨으로써 생성된다. Homocysteine 은 methionine cycle 과 cysteine 과 glutathione을 생성하는 transsulfuration 반응의 교차지점에 위치한다. Homocysteine 은 간 및 혈액 중에서 낮은 농도로 유지되고 있으며 황함유 아미노산 대사체 중 가장 활성이 높아 산화적 스트레스를 유발한다고 보고되었다 (McCully, 2009). 여러 보고들을 통하여 세포내 증가한 homocysteine 은 ER stress 유발하는 중요한 인자로 여겨진다. ER stress 는 ER 에 과도한 부하가 걸려 unfolded protein 이나 misfolded protein 이 축적되는 현상으로 unfolded protein response (UPR) 를 유도하여 ER 의 과도한 부하를 막거나, 단백질의 apoptosis 를 유도하게 된다 (Chakrabarti et al., 2011). 혈관세포를 사용한 실험에서 homocysteine 은 ER 내 단백질의 misfolding 을 야기시켰고, UPR 경로를 활성화시켜, 78 kDa glucose-regulated protein/binding immunoglobulin protein (GRP78/BiP) 와 growth arrest and DNA damage inducible proteins (GADD) 153 같은 ER stress 관련 유전자의 발현을 증가시켰다 (Outinen et al., 1998; Outinen et al., 1999). C β S 결핍 또는 ethanol 투여를 통해 hyperhomocysteinemia 를 유도한 동물실험 모델에서 GRP78 와 GADD 153 과 같은 ER stress 관련 인자들의 mRNA 와 단백질 발현이 homocysteine 의 농도가 증가함에 따라 함께 증가하였다 (Hamelet et al., 2007; Ji & Kaplowitz, 2003). 많은 연구들을 통하여 homocysteine 에 의한 세포기능 이상에 ER stress 반응이 연관되어 있다고 판단된다.

한편 ER stress 는 간에서 cholesterol 과 중성지방 대사경로를 교란하는 것으로 보고 되었다 (Werstuck et al., 2001). 비만 마우스의 간세포에서 ER stress 는 단백질 합성을 저하시켰지만, 간에서의 지질합성을 증가시켜 지방간을 유발시켰다 (Fu et al., 2011). 그리고 VLDL 구성 과

정의 중요한 단백질인 ApoB 는 간내 ER stress 에 의하여 감소되었으며, ApoB 의 감소는 간내 지질 축적의 중요한 기전이 될 수 있음이 보고되었다 (Liao & Chan, 2001; Ota et al., 2008). ER stress 는 간 내 지질합성 과정에서 핵심적인 역할을 하는 전사인자인, CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) α and β , peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), 그리고 SREBP-1 의 발현을 조절할 수 있음이 보고되었다 (Zhang et al., 2011; Lee et al., 2012a; Lee et al., 2012b). 간 내 지질합성 증가에 대한 ER stress 의 역할은 ethanol 투여모델이나 ER stress 유발물질을 직접 투여한 모델, 또는 ER stress 관련 유전자를 변형 시킨 transgenic 마우스를 통하여 연구되었다. 먼저 마우스에 대한 ethanol 의 투여는 간에서 GRP 78 과 GADD 153 과 같은 ER stress 관련 인자를 증가시켰으며, SREBP-1 의 발현을 증가시켜 ethanol 에 의한 지방간을 유발한다고 보고되었다 (Ji & Kaplowitz, 2003). ER stress 관련 유전자 변형 마우스를 사용한 실험모델에서, UPR sensor 로 알려져 있는 inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) knockout 마우스는 ER lumen 에 unfolded/misfolded 단백질의 증가를 보였다 (Zhang et al., 2011). 같은 실험에서 ER stress 유발물질로 알려져 있는 tunicamycin 을 IRE1 α knockout 마우스에 투여하였을 때, 지질합성에 관여하는 전사인자인 C/EBP β 와 PPAR γ 의 발현이 증가하여 지방간이 유발되었다. 그리고 ER stress 유발물질로 사용되는 thapsigargin 또는 tunicamycin 을 투여한 실험모델에서 지질합성에 관련된 전사인자와 효소인, C/EBP α , PPAR γ , SREBP-1c, ACC 그리고 stearyl-CoA desaturase-1 의 발현이 증가하여 간내 지질합성이 증가하였다 (Lee et al., 2012a; Lee et al., 2012b). 최근 hepatoma cell line 에 tunicamycin 을 투여한 실험에서, tunicamycin 의 투여는 AMPK 의 활성화를 저해하여, C/EBP β 와 gluconeogenesis 과정의 핵심 효소인 PEPCK 의 유전자 발현을 증가시키는 인자인 cAMP-responsive element binding (CREB) 활성을 증가시켰다 (Choudhury et al., 2011). 이러한

연구결과는 thapsigargin, tunicamycin 과 함께 ER stress 유발물질로 알려져 있는 homocysteine 이 ER stress 를 증가시켜 AMPK 의 활성화를 저해할 수 있으며, AMPK 활성억제를 통하여 간에서 지질합성을 증가에 관여할 수 있음을 시사한다.

H4IIE 세포주에 대한 homocysteine 과 betaine 의 병용처리 세포 실험에서 homocysteine 의 전처리는 AMPK 의 인산화를 감소시켰으며, 그에 따라 ACC 와 SREBP-1c 의 인산화 역시 감소하였다. Homocysteine 에 대한 betaine 의 병용처리는 AMPK, ACC 그리고 SREBP-1c 의 인산화를 회복 또는 증가시켰다. 한편 BHMT 의 단백질 발현은 homocysteine 처리에 의하여 감소하였으며, betaine 병용처리에 의하여 증가하였다. BHMT 의 단백질 발현과는 반대로 세포내 homocysteine 의 농도는 homocysteine 과 betaine 병용처리 군에서 감소하였다. 이 결과는 betaine 에 의한 homocysteine 감소와 AMPK 인산화 증가가 연관이 있음을 의미한다. 본 실험과 유사한 결과로서, 체내에 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) 의 전구체로 작용하여 betaine 과 같이 homocysteine 의 remethylation 에 관여하는 folate 를 고지방 식이와 함께 공급한 동물실험모델에서, 비만도와 인슐린 저항성이 감소하였고, 간에서 AMPK 의 활성화가 증가하였다 (Buettner et al., 2010). 또한 최근 연구에서 마우스에 고지방식이를 투여한 비알코올성 지방간 모델에서 folate 의 투여는 고지방식이에 의해 감소한 AMPK 의 인산화를 증가시켰고, HepG2 세포주에 대한 5-MTHF 의 투여는 AMPK 의 인산화를 증가시켰다 (Sid et al., 2015). 따라서 folate 와 5-MTHF 는 모두 betaine 과 같이 homocysteine 을 methionine 으로 대사시키는 remethylation 과정을 상향조절할 수 있기 때문에, betaine, folate 또는 5-MTHF 은 세포내 homocysteine 농도를 낮춤으로써 AMPK 의 활성화에 관여할 수 있음을 의미한다.

한편 본 실험에서 대표적인 AMPK 의 상위단계 인산화 효소로 알려져 있는 LKB1 의 활성화에 대한 betaine 과 homocysteine 의 영향은

불분명하였다. MCD 식이를 사용한 동물실험 모델에서 LKB1 의 인산화는 control 식이에 대한 betaine 병용투여군과 MCD 식이에 대한 betaine 의 병용투여군에서 모두 control 수준보다 증가하였고, MCD 식이 단독투여에 의하여 감소하였다. 세포실험에서 LKB1 의 인산화는 homocysteine 100 μ M 단독투여에 의하여 감소하였지만, hydroxylamine 을 통해 homocysteine 농도를 증가시켰을 때에는 영향이 없었다. 그리고 homocysteine 과 betaine 병용투여 실험모델에서 homocysteine 100 μ M 에 의하여 감소한 인산화가 homocysteine 과 betaine 1, 3 mM 병용투여에 의해 증가하지만, betaine 단독투여 실험모델에서는 변화가 없었다. LKB1 은 인산화 과정을 통하여 AMPK α subunit 에 대한 affinity 가 증가한다고 알려져 있다 (Collins et al., 2000; Xie et al., 2006; Sapkota et al., 2002). 따라서 본 실험에서는 AMPK 에 대하여 활성화된 형태인 인산화된 LKB1 을 측정하였다. 하지만 LKB1 은 인산화되는 것과는 별도로 STRAD-MO25 혹은 HSP90-CDC372 와 complex 를 이루어 핵에서 cytoplasm 으로의 이동이 증가하고, 활성이 증가될 수 있다고 보고되었다 (Baas et al., 2003; Zeqiraj et al., 2009; Milburn et al., 2004; Nony et al., 2003; Boudeau et al., 2003). 또한 AMPK 는 LKB1 이외에도 CaMKK 를 통하여 활성화에 영향을 받을 수 있다 (Stahmann et al., 2006). 따라서 LKB1 의 활성화에 대한 본 실험 결과는 homocysteine 에 의한 AMPK 활성화 억제 작용에 대해 상위단계 효소에 대한 연구가 더 필요함을 의미한다.

본 실험의 결과를 종합하면, MCD 식이공급과 hepatoma 세포주에서 homocysteine 의 직접적인 투여로 인한, 간세포 내의 homocysteine 농도의 증가는 직접적으로 AMPK 의 활성화를 억제하여 지질합성 경로를 증가시킨다. 따라서 betaine 에 의한 지질합성 억제효과는 간에서 BHMT 상향조절을 통해 homocysteine 농도를 낮춤으로써 일어남을 본 실험을 통하여 확인하였다 (Figure 21). 따라서 본 연구는 간에서 homocysteine 의 증가가 AMPK 활성화를 억제함을 보고한 첫 번째 연

구라는 점에서 큰 의의를 가진다. 이것은 최근 human neuroblastoma 세포주에서 homocysteine 에 의한 AMPK 억제를 보고한 연구와 맥락을 같이 한다 (Park et al., 2013). 따라서 AMPK 활성화에 대한 homocysteine 의 영향은 더 많은 조직의 세포주를 사용한 실험 모델에서 연구가 필요하며, homocysteine 에 의한 ER stress 와 AMPK 활성화에 대한 심도있는 연구가 필요한 것으로 판단된다.

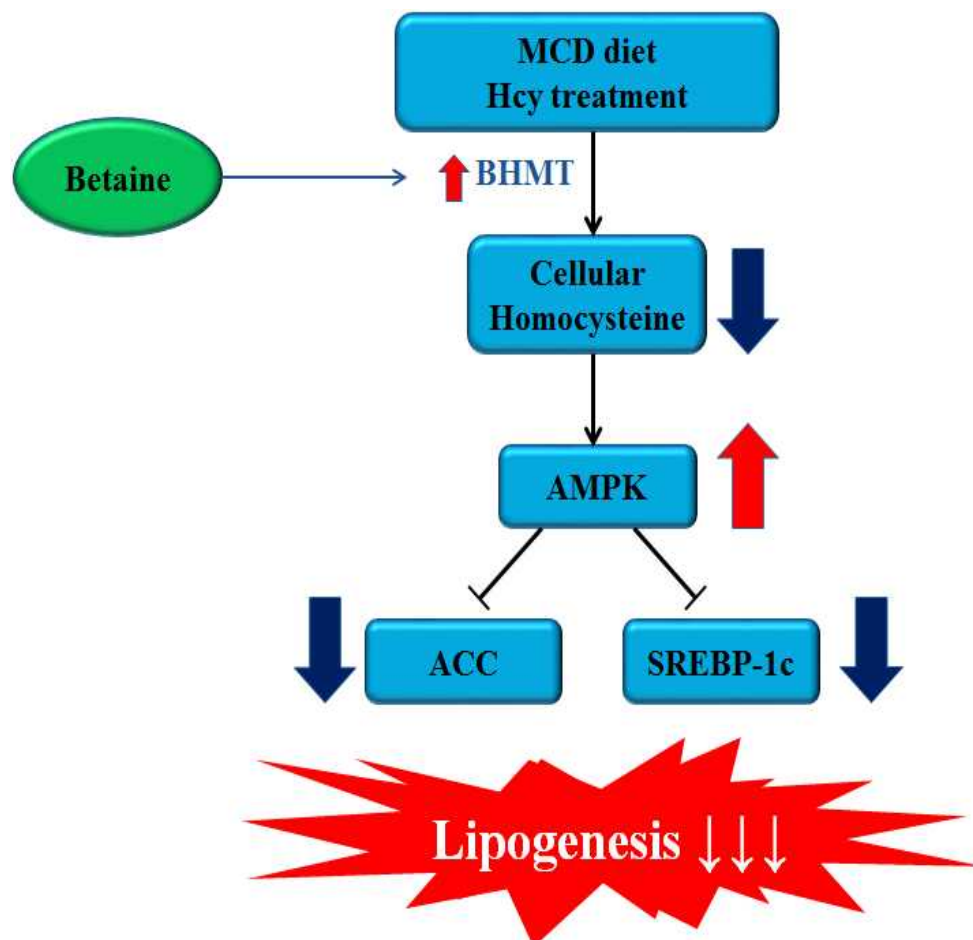


Figure 21. Proposed mechanism of betaine to the AMPK activation and lipogenesis.

결 론

본 연구에서는 betaine 의 비알코올성 지방간에 대한 효과를 확인하고, 지질합성 경로에 미치는 영향을 측정하였다. 나아가 지질합성 경로에 대한 betaine 의 영향이 BHMT 상향조절을 통한 homocysteine 대사와 관련성이 있는지를 규명하기 위하여 수행되었다.

1. MCD 식이에 대한 betaine 의 병용투여는 간에서의 지질 축적을 억제하였다.
2. MCD 식이에 대한 betaine 의 병용투여는 간에서의 BHMT 단백질 발현 증가를 통하여 homocysteine 의 농도를 감소시켰다.
3. H4IIE 세포주에서 betaine 은 BHMT 존재하에 homocysteine 농도를 저하시키고, AMPK 활성화를 증가시켰다.
4. H4IIE 세포주에서 betaine 은 BHMT 존재하에 AMPK 하위단계 타겟인, ACC 와 SREBP-1c 를 불활성화 시켰다.
5. HepG2 세포주와 H4IIE 세포주에서, homocysteine 농도증가는 세포 실험에서 AMPK 의 인산화를 억제하였다.
6. H4IIE 세포주에서 homocysteine 과 betaine 의 병용투여는 homocysteine 투여에 의해 증가한 homocysteine 농도를 감소시켰다.
7. H4IIE 세포주에서 homocysteine 과 betaine 의 병용투여는 homocysteine 투여에 의해 감소한 AMPK 의 활성화를 증가시켰다.
8. Homocysteine 은 간세포에서 직접적으로 AMPK 를 불활성화 시키며, betaine 은 BHMT 상향조절을 통해 homocysteine 농도를 저하시킴으로써 지방간 생성을 저해할 수 있다.

참고 문헌

식약처 보도자료. (2013).

<http://www.mfds.go.kr/index.do?searchkey=title:contents&division=y=0&searchword=지방간&x=0&mid=675&pageNo=1&seq=19618&cmd=v>

통계청 통계자료. (2015).

http://kosis.kr/statisticsList/statisticsList_01List.jsp?vwcd=MT_ZTITLE&parmTabId=M_01_01

Abdelmalek M. F., Angulo P., Jorgensen R. A., Sylvestre P. B., & Lindor K. D. (2001). Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *The American Journal of Gastroenterology*, 96, 2711 - 2717.

Ahn, C. W., Choi, Y. J., Hong, S. H., Jun, D. S., Na, J. D., Choi, Y. J., & Kim, Y. C. (2015). Involvement of multiple pathways in the protection of liver against high-fat diet-induced steatosis by betaine. *Journal of Functional Foods*, 17, 66-72.

Aissa A. F., Tryndyak V., de Conti A., Melnyk S., Gomes T. D., Bianchi M. L., James S. J., Beland F. A., Antunes L. M., & Pogribny I. P. (2014). Effect of methionine-deficient and methionine-supplemented diets on the hepatic one-carbon and lipid metabolism in mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58, 1502-1512.

Andreelli F., Foretz M., Knauf C., Cani P. D., Perrin C., Iglesias M. A., Pillot B., Bado A., Tronche F., Mithieux G., Vaulont S., Burcelin R., & Viollet B. (2006). Liver adenosine monophosphate-activated kinase alpha2 catalytic subunit is a key target for the control of

- hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. *Endocrinology*, 147, 2432 - 2441.
- Asimakopoulou, A., Panopoulos, P., Chasapis, C. T., Coletta, C., Zhou, Z., Cirino, G., Giannis, A., Szabo, C., Spyroulias, G. A., & Papapetropoulos, A. (2013). Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE). *British Journal of Pharmacology*, 169, 922-932.
- Avila M. A., Berasain C., Torres L., Martín-Duce A., Corrales F. J., Yang H., Prieto J., Lu S. C., Caballería J., Rodés J., & Mato J. M. (2000). Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 33, 907-914.
- Baas A. F., Boudeau J., Sapkota G. P., Smit L., Medema R., Morrice N. A., & Alessi D. R., & Clevers H. C. (2003). Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *EMBO Journal*, 22, 3062 - 3072.
- Banerjee R., Evande R., Kabil O., Ojha S., & Taoika S. (2003). Reaction mechanism and regulation of cystathionine beta-synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1647, 30-35.
- Barak A. J., & Tuma D. J. (1979). A simplified procedure for the determination of betaine in liver. *Lipids*, 14, 860-863.
- Bergeron R., Ren J. M., Cadman K. S., Moore I. K., Perret P., Pypaert M., Young L. H., Semenkovich C. F., & Shulman G. I. (2001). Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 281, E1340 - 1346.
- Best C. H. (1934). The role of the liver in the metabolism of

- carbohydrate and fat. *Lancet*, 226, 1274 - 1277.
- Best C. H., & Huntsman M. E. (1932). The effects of the components of lecithine upon digestion of fat in the liver. *The Journal of Physiology*, 75, 405 - 412.
- Best C. H., Ferguson G. C., & Hershey J. M. (1933). Choline and liver fat in diabetic dogs. *The Journal of Physiology*, 79, 94 - 102.
- Best C. H., Ridout J. H., & Lucas C. C. (1969). Alleviation of dietary cirrhosis with betaine and other lipotropic agents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 47, 73 - 79.
- Bostom A. G., & Lathrop L. (1997). Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney International*, 52, 10-20.
- Boudeau J., Deak M., Lawlor M. A., Morrice N. A., & Alessi D. R. (2003). Heat-shock protein 90 and Cdc37 interact with LKB1 and regulate its stability. *The Biochemical Journal*, 370, 849 - 857.
- Buettner R., Bettermann I., Hecht C., Gäbele E., Hellerbrand C., Schölmerich J., & Bollheimer L. C. (2010). Dietary folic acid activates AMPK and improves insulin resistance and hepatic inflammation in dietary rodent models of the metabolic syndrome. *Hormone and Metabolic Research*, 42, 769-774.
- Cantoni G. L. (1975). Biological methylation: selected aspects. *Annual Review of Biochemistry*, 44, 435-451.
- Carling, D. (2005). AMP-activated protein kinase: balancing the scales. *Biochimie*, 87, 87 - 91.
- Chakrabarti A., Chen A. W., & Varner J. D. (2011). A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 2777-2293.

- Chawla R. K., Watson W. H., Eastin C. E., Lee E. Y., Schmidt J., & McClain C. J. (1998). S-adenosylmethionine deficiency and TNF- α in lipopolysaccharide-induced hepatic injury. *The American Journal of Physiology*, 275, G125-129.
- Chen Z., Heierhorst J., Mann R. J., Mitchelhill K. I., Michell B. J., Witters L. A., Lynch G. S., Kemp B. E., & Stapleton D. (1999). Expression of the AMP-activated protein kinase β 1 and β 2 subunits in skeletal muscle. *FEBS Letters*, 460, 343-348.
- Choudhury M., Qadri I., Rahman S. M., Schroeder-Gloeckler J., Janssen R. C., & Friedman J. E. (2011). C/EBP β is AMP kinase sensitive and up-regulates PEPCK in response to ER stress in hepatoma cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 331, 102-108.
- Collins S. P., Reoma J. L., Gamm D. M., & Uhler M. D. (2000). LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. *The Biochemical Journal*, 345, 673 - 680.
- Cooper A. J., (1983) Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 187-222.
- Corton J. M., Gillespie J. G., Hawley S. A., & Hardie D. G. (1995). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *European Journal of Biochemistry*, 229, 558 - 565.
- Craig S. A. (2004). Betaine in human nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 539-549.
- da Silva Xavier G., Leclerc I., Varadi A., Tsuboi T., Moule S. K., & Rutter G. A. (2003). Role for AMP-activated protein kinase in glucose-stimulated insulin secretion and preproinsulin gene

- expression. *The Biochemical Journal*, 371, 761 - 774.
- Davies S. P., Sim A. T., & Hardie D. G. (1990). Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase. *European Journal of Biochemistry*, 187, 183 - 190.
- Deminice R., Rosa F. T., da Silva L. E., & Jordao A. A. (2014). Taurine supplementation does not decrease homocysteine levels and liver injury induced by a choline-deficient diet. *Life Sciences*, 105, 43-47.
- Eastin C. E., McClain C. J., Lee E. Y., Bagby G. J., & Chawla R. K. (1997). Choline deficiency augments and antibody to tumor necrosis factor-alpha attenuates endotoxin-induced hepatic injury. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 21, 1037-1041.
- Eloranta T. O., & Kajander E. O. (1984). Catabolism and lability of S-adenosyl-L-methionine in rat liver extracts. *The Biochemical Journal*, 224, 137-144.
- Eskes T. K. (1998). Open or closed? A world of difference: a history of homocysteine research. *Nutrition Reviews*, 56, 236-44.
- Fan J. G., & Farrell G. C. (2009). Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China. *Journal of Hepatology*, 50, 204 - 10
- Ferré P., & Foufelle F. (2010). Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 2, 83-92.
- Finkelstein J. D. (1990). Methionine metabolism in mammals. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1, 228-237.
- Finkelstein J. D. (2000). Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Seminars in Thrombosis and Homeostasis*, 26, 219-225.

- Finkelstein J. D., & Martin J. J. (1984). Inactivation of betaine-homocysteine methyltransferase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochemical and Biophysical research communications*, 1118, 14-19.
- Finkelstein J. D., Cello J. P., & Kyle W. E. (1974). Ethanol-induced changes in methionine metabolism in rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 61, 525-31.
- Finkelstein J. D., Harris B. J., Martin J. J., & Kyle W. E. (1982a). Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary methionine. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 108, 344-348.
- Finkelstein J. D., Martin J. J., Harris B. J., & Kyle W. E. (1982b). Regulation of the betaine content of rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 218, 169-173.
- Finkelstein J. D., Martin J. J., Harris B. J., & Kyle W. E. (1983). Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary betaine., *Journal of Nutrition*, 113, 519-521.
- Fisslthaler B., & Fleming I. (2009). Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation Research*, 105, 114 - 127.
- Foretz M., Ancellin N., Andreelli F., Saintillan Y., Grondin P., Kahn A., Thorens B., Vaulont S., & Viollet B. (2005). Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes*, 54, 1331 - 1339.
- Foretz M., Carling D., Guichard C., Ferre P., & Foulfelle F. (1998). AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated

- expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 14767 - 14771.
- Fu S., Yang L., Li P., Hofmann O., Dicker L., Hide W., Lin, X., Watkins S. M., Ivanov A. R., & Hotamisligil G. S. (2011). Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature*, 473, 528 - 531.
- Garcia-Perez A., & Burg M. B. (1991). Renal medullary organic osmolytes. *Physiological Reviews*, 71, 1081-1115.
- García-Tevijano E. R., Berasain C., Rodríguez J. A., Corrales F. J., Arias R., Martín-Duce A., Caballería J., Mato J. M., & Avila M. A. (2001). Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis. *Hypertension*, 38, 1217-1221.
- Ghoshal A. K. (1995). New insight into the biochemical pathology of liver in choline deficiency. *Critical Reviews of Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 263-273.
- Grossman E. B., & Herbert S. C. (1989). Renal inner medullary choline dehydrogenase activity: characterization and modulation. *The American Journal of Physiology*, 256, F107-112.
- Hamaguchi M., Kojima T., Takeda N., Nakagawa T., Taniguchi H., Fujii K., Omatsu T., Nakajima T., Sarui H., Shimazaki M., Kato T., Okuda J., & Ida K. (2005). The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Internal Medicine*, 143, 722 - 728
- Hamelet, J., Demuth, K., Paul, J. L., Delabar, J. M., & Janel, N. (2007). Hyperhomocysteinemia due to cystathionine beta synthase deficiency induces dysregulation of genes involved in hepatic lipid homeostasis in mice. *Journal of Hepatology*, 46, 151-159.
- Hardie D. G. (2007). AMP-activated protein kinase as a drug target.

- Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 47, 185 - 210.
- Hawley S. A., Boudeau J., Reid J. L., Mustard K. J., Udd L., Mäkelä T. P., Alessi D. R., & Hardie D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of Biology*, 2, 28.
- Hawley S. A., Pan D. A., Mustard K. J., Ross L., Bain J., Edelman A. M., Frenguelli B. G., & Hardie D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP activated protein kinase. *Cell Metabolism*, 2, 9 - 19.
- Hofmann M. A., Lalla E., Lu Y., Gleason M. R., Wolf B. M., Tanji N., Ferran L. J. Jr., Kohl B., Rao V., Kisiel W., Stern D. M., & Schmidt A. M. (2001). Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *The Journal of Clinical Investigation*, 107, 675-683.
- Horio M., Ito A., Matsuoka Y., Moriyama T., Orita Y., Takenaka M., & Imai E. (2001). Apoptosis induced by hypertonicity in MadinDarleycanine kidney cells: protective effect of betaine. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 16, 483-490.
- Horton J. D., Shah N. A., Warrington J. A., Anderson N. N., Park S. W., Brown M. S., & Goldstein J. L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 12027-12032.
- Igolnikov A. C., & Green R. M. (2006). Mice heterozygous for the *Mdr2* gene demonstrate decreased PEMT activity and diminished steatohepatitis on the MCD diet. *Journal of Hepatology*, 44, 586-592.

- Jacobs R. L., House J. D., Brosnan M. E., & Brosnan J. T. (1998). Effects of streptozotocin-induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes*, 47, 1967-1970.
- Ji C., & Kaplowitz N. (2003). Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology*, 124, 1488-1499.
- Ji C., & Kaplowitz N. (2004). Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World Journal of Gastroenterology*, 10, 1699-1708.
- Ji C., Deng Q., & Kaplowitz N. (2004). Role of TNF-alpha in ethanol-induced hyperhomocysteinemia and murine alcoholic liver injury. *Hepatology*, 40, 442-451.
- Ji C., Shinohara M., Vance D., Than T. A., Ookhtens M., Chan C., & Kaplowitz N. (2008). Effect of transgenic extrahepatic expression of betaine-homocysteine methyltransferase on alcohol or homocysteine-induced fatty liver. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 32, 1049-1058.
- Jump D. B., Botolin D., Wang Y., Xu J., Christian B., & Demeure O. (2005). Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *The Journal of Nutrition*, 135, 2503-2506.
- Jung Y. S., Kim S. J., Kwon D. Y., Ahn C. W., Kim Y. S., Choi D. W., & Kim Y. C. (2013). Alleviation of alcoholic liver injury by betaine involves an enhancement of antioxidant defense via regulation of sulfur amino acid metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 292-298.
- Kharbanda, K. K. (2007). Role of transmethylation reactions in alcoholic liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 13, 4947 - 4954.

- Kharbanda K. K., Todero S. L., Ward B. W., Cannella, J. J., 3rd, & Tuma, D. J. (2009). Betaine administration corrects ethanol-induced defective VLDL secretion. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 327, 75 - 78.
- Kiens B. (2006). Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiological Reviews*, 86, 205 - 243.
- Kim J. B., Sarraf P., Wright M., Yao K. M., Mueller E., Solanes G., Lowell B. B., & Spiegelman B. M. (1998). Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *The Journal of Clinical Investigation*, 101, 1-9.
- Kim K. H., (1997). Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annual Review of Nutrition*, 17, 77 - 99.
- Kim S. K., & Kim Y. C. (2005). Effects of betaine supplementation on hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids in mice. *Journal of hepatology*, 42, 907-913.
- Kim S. K., & Kim Y. C. (2002). Attenuation of bacterial lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity by betaine or taurine in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 545-549.
- Kim S. K., Seo J. M., Chae Y. R., Jung Y. S., Park J. H., & Kim Y. C. (2009). Alleviation of dimethylnitrosamine-induced liver injury and fibrosis by betaine supplementation in rats. *Chemico-Biological Interaction*, 177, 204-211.
- Kim Y. C., Jung Y. S., & Kim S. K. (2005). Effect of betaine supplementation on changes in hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids and experimental cholestasis induced by alpha-naphthylisothiocyanate. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 663-670.

- Kwon D. Y., Jung Y. S., Kim S. J., Park H. K., Park J. H., & Kim Y. C. (2009). Impaired sulfur-amino acid metabolism and oxidative stress in nonalcoholic fatty liver are alleviated by betaine supplementation in rats. *The Journal of Nutrition*, 139, 63-68.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lee J. S., Mendez R., Heng H. H., Yang Z. Q., & Zhang K. (2012a). Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *American Journal of Translational Research*, 4, 102-113.
- Lee J. S., Zheng Z., Mendez R., Ha S. W., Xie Y., & Zhang K. (2012b). Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model. *Toxicology Letters*, 211, 29-38.
- Lehmann M., Gottfries C. G., Regland B. (1999). Identification of cognitive impairment in the elderly: homocysteine is an early marker. *Dementia Geriatric Cognitive Disorders*, 10, 12-20.
- Li Y., Xu S., Mihaylova M. M., Zheng B., Hou X., Jiang B., Park O., Luo Z., Lefai E., Shyy J. Y., Gao B., Wierzbicki M., Verbeuren T. J., Shaw R. J., Cohen R. A., & Zang M. (2011). AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metabolism*, 13, 376-388.
- Liao W., & Chan L. (2001). Tunicamycin induces ubiquitination and degradation of apolipoprotein B in HepG2 cells. *The Biochemical Journal*, 353, 493 - 501.
- Liber C. S., & DeCarli L. M. (1991). Hepatotoxicity of ethanol. *Journal of Hepatology*, 12, 394-401.

- Lluis J. M., Colell A., García-Ruiz C., Kaplowitz N., & Fernández-Checa J. C. (2003). Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress. *Gastroenterology*, 124, 708-724.
- Lochhead P. A., Salt I. P., Walker K. S., Hardie D. G., & Sutherland C. (2000). 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PECK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes*, 49, 896 - 903.
- Lombardi B., Pani P., & Schlunk F. F. (1968). Choline-deficiency fatty liver: impaired release of hepatic triglycerides. *Journal of Lipid Research*, 9, 437-446.
- Lowry O. H, Rosebrough N. J., Farr A. L., & Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lu S. C. (2000a). Regulation of glutathione synthesis. *Current Topics in Cell Regulation*, 36, 95-116.
- Lu S. C. (2000b). S-adenosylmethionine. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 32, 391-395.
- Lu S. C., & Mato J. M. (2005). Role of methionine adenosyltransferase and S-adenosyl-methionine in alcoholic-associated liver cancer. *Alcohol*, 35, 227-234.
- Lu S. C., Alvarez L., Huang Z. Z., Chen L., An W., Corrales F. J., Avila M. A., Kanel G., & Mato J. M. (2001). Methionine adenosyltransferase1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 5560-5565.

- Luyckx F. H., Lefebvre P. J., & Scheen A. J. (2000). Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes and metabolism*, 26, 98-106.
- Mahlapuu M., Johansson C., Lindgren K., Hjälm G., Barnes B. R., Krook A., Zierath J. R., Andersson L., & Marklund S. (2004). Expression profiling of the gamma-subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 286, E194-200.
- Martínez-Chantar M. L., Corrales F. J., Martínez-Cruz L. A., García-Trevijano E. R., Huang Z. Z., Chen L., Kanel G., Avila M. A., Mato J. M., & Lu S. C. (2002a). Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase1A. *The American Journal of Physiology*, 287, 497-502.
- Martínez-Chantar M. L., García-Trevijano E. R., Latasa M. U., Pérez-Mato I., Sánchez del Pino M. M., Corrales F. J., Avila M. A., & Mato J. M. (2002b). Importance of a deficiency in S-adenosyl-L-methionine synthesis in the pathogenesis of liver injury. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 1177S-1182S.
- Mato J. M., & Lu S. C. (2005). Homocysteine, the bad thiol. *Hepatology*, 41, 976-979.
- Mato J. M., Corrales F. J., Lu S. C., & Avila M. A. (2002). S-adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *FASEB Journal*, 16, 15-26.
- Matteoni C. A., Younossi Z. M., Gramlich T., Boparai N., Liu Y. C., & McCullough A. J. (1999). Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 116,

1413-1419.

McClain C. J., Mokshagundam S. P., Barve S. S., Song Z., Hill D. B., Chen T., & Deaciuc I. (2004b). Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Alcohol*, 34, 67-79.

McClain C. J., Song Z., Barve S. S., Hill D. B., & Deaciuc I. (2004a). Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287, 497-502.

McCully K. S. (2009). Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 39, 219-232.

Miglio F., Rovati L. C., Santoro A., & Setnikar I. (2000). Efficacy and safety of oral betaine glucuronate in non-alcoholic steatohepatitis. A double-blind, randomized, parallel-group, placebo-controlled prospective clinical study. *Arzneimittel-Forschung*, 50, 722 - 727.

Milburn C. C., Boudeau J., Deak M., Alessi D. R., & van Aalten, D. M. F. (2004). Crystal structure of MO25a in complex with the C terminus of the pseudo kinase STE20-related adaptor. *Natural Structural and Molecular Biology*, 11, 193 - 200.

Munday M. R., Campbell D. G., Carling D., & Hardie D. G. (1988). Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *European Journal of Biochemistry*, 175, 331 - 338.

Muoio D. M., Seefeld K., Witters L. A., & Coleman R. A. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *The*

- Biochemical Journal, 338, 783 - 791.
- Nguyen P., Leray V., Diez M., Serisier S., Le Bloch J., Siliart B., & Dumon H. (2008). Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92, 272-283.
- Nolin, T. D., McMenamin, M. E., & Himmelfarb, J. (2007). Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high performance liquid chromatography: application to studies of oxidative stress. *Journal of Chromatography B*, 852, 554-561.
- Nony P., Gaude H., Rossel M., Fournier L., Rouault J. P., & Billaud M. (2003). Stability of the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1 requires its binding to the molecular chaperones Hsp90/Cdc37. *Oncogene*, 22, 9165 - 9175.
- Oakhill J. S., Chen Z. P., Scott J. W., Steel R., Castelli L. A., Ling N., Macaulay S. L., & Kemp B. E. (2010). β -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 19237-19241.
- Oakhill J. S., Steel R., Chen Z. P., Scott J. W., Ling N., Tam S., & Kemp B. E. (2011). AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science*, 332, 1433-1435.
- Ota, T., Gayet, C., & Ginsberg, H. N. (2008). Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *The Journal of Clinical Investigation*, 118, 316 - 332.
- Ou X., Yang H., Ramani K., Ara A. I., Chen H., Mato J. M., & Lu S. C. (2007). Inhibition of human betaine-homocysteine

- methyltransferase expression by S-adenosylmethionine and methylthioadenosine. *The Biochemical Journal*, 401, 87-96.
- Outinen P. A., Sood S. K., Liaw P. C., Sarge K. D., Maeda N., Hirsh J., Ribau J., Podor T. J., Weitz J. I., & Austin R. C. (1998). Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine. *The Biochemical Journal*, 332, 213-221.
- Outinen P. A., Sood S. K., Pfeifer S. I., Pamidi S., Podor T. J., Li J., Weitz J. I., & Austin R. C. (1999). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood*, 94, 959-967.
- Park H. S., Jeon B. H., Woo S. H., Leem J., Jang J. E., Cho M. S., Park I. S., Lee K. U., & Koh E. H. (2011). Time-dependent changes in lipid metabolism in mice with methionine choline deficiency-induced fatty liver disease. *Molecules and Cells*, 32, 571-577.
- Park S. H., Jeon W. K., Kim S. H., Kim H. J., Park D. I., Cho Y. K., Sung I. K., Sohn C. I., Keum D. K., & Kim B. I. (2006). Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21, 138 - 143
- Park Y. J., Ko J. W., Jang Y., & Kwon Y. H. (2013). Activation of AMP-activated protein kinase alleviates homocysteine-mediated neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *Neurochemical Research*, 38, 1561-1571.
- Poddar R., Sivasubramanian N., Dibello P. M., Robinson K., & Jacobsen D. (2001). Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human

- aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation*, 103, 2717 - 2723.
- Portincasa P., Grattagliano I., Palmieri V. O., & Palasciano G. (2005). Nonalcoholic steatohepatitis: recent advances from experimental models to clinical management. *Clinical Biochemistry*, 38, 203-217.
- Rajendra W. (1987). High performance liquid chromatographic determination of amino acids in biological samples by precolumn derivatization with O-phthaldehyde. *Journal of Liquid Chromatography*, 10, 941-955
- Ramellini G, Meldolesi J. (1976) Liver protection by silymarin: in vitro effect on dissociated rat hepatocytes. *Arzneimittelforschung*. 26:69-73
- Ratnam S., Wijekoon E. P., Hall B., Garrow T. A., Brosnan M. E., & Brosnan J. T. (2006). Effects of diabetes and insulin on betaine-homocysteineS-methyltransferase expression in rat liver. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 290, E933-939.
- Refsum H., Ueland P. M., Nygård O., & Vollset S. E. (1998). Homocysteine and cardiovascular disease. *Annual Review of Medicine*, 49, 31-62.
- Review T., LaBrecque D. R., Abbas Z., Anania F., Ferenci P., Khan A. G., Goh K. L., Hamid S. S., Isakov V., Lizarzabal M., Penaranda M. M., Ramos J. F, Sarin S., Stimac D., Thomson A. B., UmarM., Krabshuis J., & LeMair A. (2014). World Gastroenterology Organisation global guidelines: nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 48, 467 - 473
- Sakamoto K., Zarrinpashneh E., Budas G. R., Pouleur A. C., Dutta

- A., Prescott A. R., Vanoverschelde J. L., Ashworth A., Jovanović A., Alessi D. R., & Bertrand L. (2006). Deficiency of LKB1 in heart prevents ischemia-mediated activation of AMPKalpha2 but not AMPKalpha1. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 290, E780-788.
- Sanders M. J., Grondin P. O., Hegarty B. D., Snowden M. A., & Carling D. (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J*, 403, 139-148.
- Sapkota G. P., Deak M., Kieloch A., Morrice N., Goodarzi A. A., Smythe C., Shiloh Y., Lees-Miller S. P., & Alessi D. R. (2002). Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366. *The Biochemical Journal*, 368, 507 - 516.
- Schäfer, C., Hoffmann, L., Heldt, K., Lornejad-Schäfer, M. R., Brauers, G., Gehrman, T., Garrow, T. A., Häussinger, D., Mayatepek, E., Schwahn, B. C., & Schliess, F. (2007). Osmotic regulation of betaine homocysteine-S-methyltransferase expression in H4IIE rat hepatoma cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292, G1089-1098.
- Schwahn B. C., Chen Z., Laryea M. D., Wendel U., Lussier-Cacan S., Genest J. J., Mar M. H., Zeisel S. H., Castro C., Garrow T., Rozen R. (2003). Homocysteine-betaine interactions in a murine model of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *FASEB Journal*, 17, 512 - 514.
- Schwahn B. C., Laryea M. D., Chen Z., Melnyk S., Pogribny I., Garrow T., James S. J., & Rozen R. (2004). Betaine rescue of an animal model with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency.

- The Biochemical Journal, 382, 831 - 840.
- Sedgwick B., Cornforth J. W., French S. J., Gray R. T., Kelstrup E., & Willadsen P. (1977). The biosynthesis of long-chain fatty acids. Incorporation of radioactivity from stereospecifically tritiated malonyl thiol esters, and the stereochemistry of the acetyl-CoA carboxylase reaction. *European Journal of Biochemistry*, 75, 481-495.
- She Q. B., Nagao I., Hayakawa T. & Tsuge H. (1994). A simple HPLC method for the determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rat tissues: the effect of vitamin B6 deficiency on these concentrations in rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 205, 1748-1754
- Sid V., Wu N., Sarna L. K., Siow Y. L., House J. D., & O K. (2015). Folic acid supplementation during high-fat diet feeding restores AMPK activation via an AMP-LKB1-dependent mechanism. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 309, R1215-1225.
- Slow S., & Grrrow T. A. (2006). Liver choline dehydrogenase and kidney betaine homocysteine methyltransferase expression are not affected by methionine or choline intake in growing rats. *The Journal of Nutrition*, 136, 2279-2283.
- Smith D. P., Spicer J., Smith A., Swift S., & Ashworth A. (1999). The mouse Peutz-Jeghers syndrome gene *Lkb1* encodes a nuclear protein kinase. *Human Molecular Genetics*, 8, 1479-1485.
- Song, Z., Deaciuc, I., Zhou, Z., Song, M., Chen, T., Hill, D., & McClain, C. J. (2007). Involvement of AMP-activated protein kinase in beneficial effects of betaine on high sucrose diet-induced hepatic steatosis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293, G894-902.

- Sowden M. P., Collins H. L., Smith H. C., Garrow T. A., Sparks J. D., & Sparks C. E. (1999). Apolipoprotein B mRNA and lipoprotein secretion are increased in McArdle RH-7777 cells by expression of betaine-homocysteine S-methyltransferase. *The Biochemical Journal*, 341, 639-645.
- Sparks, J. D., Collins, H. L., Chirieac, D. V., Cianci, J., Jokinen, J., Sowden, M. P., Galloway, C. A., & Sparks, C. E. (2006). Hepatic very-low-density lipoprotein and apolipoprotein B production are increased following in vivo induction of betaine-homocysteine S-methyltransferase. *The Biochemical Journal*, 395, 363 - 371.
- Stahmann N., Woods A., Carling D., & Heller R. (2006). Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *Molecular and Cellular Biology*, 26, 5933 - 5945.
- Stead L. M., Brosnan J. T., Vance D. E., Jacobs R. L. (2006). Is it time to reevaluate methyl balance in humans? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 5-10.
- Steinberg G. R., Macaulay S. L., Febbraio M. A., & Kemp B. E. (2006). AMP-activated protein kinase - the fat controller of the energy railroad. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 84, 655 - 665.
- Steinberg GR, & Kemp BE. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 89, 1025 - 1078.
- Stipanuk M. H. (2004). Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annual Review of Nutrition*, 24, 539-577.
- Stipanuk M. H., Dominy J. E. Jr., Lee J. I. & Coloso R. M. (2006). Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of

- cysteine metabolism. *The Journal of Nutrition*, 136, 1652S-1659S.
- Sutherland C. M., Hawley S. A., McCartney R. R., Leech A., Stark M. J., Schmidt M. C., & Hardie D. G. (2003). Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Current Biology*, 13, 1299-305.
- Tang X., Shen T., Jiang X., Xia M., Sun X., Guo H., & Ling W. (2015). Purified anthocyanins from bilberry and black currant attenuate hepatic mitochondrial dysfunction and steatohepatitis in mice with methionine and choline deficiency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21, 63, 552-561.
- Teng Y. W., Mehedint M. G., Garrow T. A., & Zeisel S. H. (2011). Deletion of betaine-homocysteine S-methyltransferase in mice perturbs choline and 1-carbon metabolism, resulting in fatty liver and hepatocellular carcinomas. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 36258 - 36267.
- Tiainen M., Vaahtomeri K., Ylikorkala A., & Makela T. P. (2002). Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: Induction of p21 (WAF1/CIP1). *Human Molecular Genetics*, 11, 1497 - 1504.
- Torres L., García-Trevijano E. R., Rodríguez J. A., Carretero M. V., Bustos M., Fernández E., Eguinoa E., Mato J. M., & Avila M. A. (1999). Induction of TIMP-1 expression in rat hepatic stellate cells and hepatocytes: a new role for homocysteine in liver fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1455, 12-22.
- Towler M. C., & Hardie D. G. (2007). AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circulation Research*, 16, 328 - 341.
- Varela-Moreiras G., Selhub J., Da Costa K. A., Zeisel S. H. (1992). Effect of chronic choline deficiency in rats on liver folate content

- and distribution. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 3, 519-522.
- Veteläinen R., van Vliet A., & van Gulik TM. (2007). Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22, 1526-1533.
- Webster G. T. (1942). Cirrhosis of the liver among rats receiving diets poor in protein and rich in fat. *The Journal of Clinical Investigation*, 21, 385 - 392.
- Weik C., Warskulat U., Bode J., Peters-Regehr T., & Häussinger D. (1998). Compatible organic osmolytes in rat liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*, 27, 569-575.
- Werstuck G. H., Lentz S. R., Dayal S., Hossain G. S., Sood S. K., Shi Y. Y., Zhou J., Maeda N., Krisans S. K., Malinow M. R., & Austin R. C. (2001). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest*, 107, 1263-1273.
- Wijekoon E. P., Hall B., Ratnam S., Brosnan M. E., Zeisel S. H., & Brosnan J. T. (2005). Homocysteine metabolism in ZDF (type2) diabetic rats. *Diabetes*, 54, 3245-3251.
- Woods A., Azzout-Marniche D., Foretz M., Stein S. C., Lemarchand P., Ferre P., Foufelle F., & Carling D. (2000). Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 6704 - 6711.
- Woods A., Johnstone S. R., Dickerson K., Leiper F. C., Fryer L. G., Neumann D., Schlattner U., Wallimann T., Carlson M., & Carling

- D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current Biology*, 13, 2004-2008.
- Xiao B., Heath R., Saiu P., Leiper F.C., Leone P., Jing C., Walker P. A., Haire L., Eccleston J. F., Davis C. T., Martin S. R., Carling D., & Gamblin S. J. (2007). Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature*, 449, 496-500.
- Xiao B., Sanders M. J., Underwood E., Heath R., Mayer F. V., Carmena D., Jing C., Walker P. A., Eccleston J. F., Haire L. F., Saiu P., Howell S. A., Aasland R., Martin S. R., Carling D., & Gamblin S. J. (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*, 472, 230-233.
- Xie Z. L., Dong Y. Z., Zhang M., Cui M. Z., Cohen R. A., Riek U., Neumann D., Schlattner U., & Zou M. H. (2006). Activation of protein kinase C ζ by peroxynitrite regulates LKB1-dependent AMP-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 6366 - 6375.
- Xu L., Huang D., Hu Q., Wu J., Wang Y., & Feng J.. (2015). Betaine alleviates hepatic lipid accumulation via enhancing hepatic lipid export and fatty acid oxidation in rats fed with a high-fat diet. *The British Journal of Nutrition*, 113, 1835-1843.
- Yao Z. M., & Vance D. E. (1989). Head group specificity in the requirement of phosphatidylcholine biosynthesis for very low density lipoprotein secretion from cultured hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 11373 - 11380.
- Younossi Z. M., Stepanova M., Afendy M., Fang Y., Younossi Y., Mir H., & Srishord M. (2011). Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clinical*

- Zeisel S. H. (1981). Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Annual Review of Nutrition*, 1, 95-121.
- Zeisel S. H. (2006). Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annual Review of Nutrition*, 26, 229-250.
- Zeisel S. H., Zola T., daCosta K. A., & Pomfret E. A. (1989). Effect of choline deficiency on S-adenosylmethionine and methionine concentrations in rat liver. *The Biochemical Journal*, 259, 725-729.
- Zeqiraj E., Filippi B. M., Deak M., Alessi D. R., & van Aalten D. M. F. (2009). Structure of the LKB1 - STRAD - MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science*, 326, 1707 - 1711.
- Zhang F., Warskulat U., & Häussinger D. (1996a). Modulation of tumor necrosis factor-alpha release by anisoosmolarity and betaine in rat liver macrophages (Kupffer cells). *FEBS Letters*, 391, 293-296.
- Zhang F., Warskulat U., Wettstein M., & Häussinger D. (1996b). Identification of betaine as an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *Gastroenterology*, 110, 1543-1552.
- Zhang J., Gao S., Duan Z., & Hu K. Q. (2016). Overview on acute-on-chronic liver failure. *Frontiers of Medicine*, 10, 1-17.
- Zhang K., Wang S., Malhotra J., Hassler J. R., Back S. H., Wang G., Chang L., Xu W., Miao H., Leonardi R., Chen Y. E., Jackowski S., & Kaufman R. J. (2011). The unfolded protein response transducer IRE1 alpha prevents ER stress-induced hepatic steatosis. *The EMBO Journal*, 30, 1357 - 1375.

Abstract

The anti-lipogenic effect of betaine in rats fed methionine and choline-deficient diet (MCD) was investigated. Intake of MCD for 3 wk resulted in a significant accumulation of hepatic lipids, which was prevented by betaine supplementation in drinking water (1%). Phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK), acetyl-CoA carboxylase (ACC), sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), and liver kinase B1 (LKB1) was inhibited by MCD intake, and these changes were all inhibited by betaine feeding. Meanwhile, betaine supplementation reversed the reduction of methionine and S-adenosylmethionine (SAM), and the elevation of homocysteine levels in the liver, which could be attributable to the induction of betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and methionine adenosyltransferase (MAT). Different cell lines were used to clarify the role of homocysteine on activation of the AMPK pathway. Homocysteine treatment decreased pAMPK, pACC, pSREBP-1c and pLKB1 in HepG2 cells. Metformin-induced activation of AMPK was also inhibited by homocysteine. Treatment with hydroxylamine (HA), a cystathionine β -synthase inhibitor, resulted in a reduction of pAMPK, pACC and pSREBP-1c, accompanied by an elevation of intracellular homocysteine. Betaine treatment prevented the homocysteine-induced reduction of pAMPK, pACC, pSREBP-1c and pLKB1 in H4IIE cells, but not in HepG2 cells. Also the elevation of cellular homocysteine and inhibition of protein expression of BHMT were prevented by betaine only in H4IIE cells which express BHMT. The results suggest that the beneficial effect of betaine against hepatic lipid accumulation may be attributed, at least in part,

to the depletion of homocysteine via up-regulation of BHMT in hepatocytes.

Kew words: Non-alcoholic fatty liver disease, Triglyceride, Betaine, Homocysteine, Betaine-homocysteine methyltransferase, AMP-activated protein kinase, Acetyl-CoA carboxylase, Sterol regulatory element binding protein-1c, Endoplasmic reticulum stress.

Student number: 2008-23248